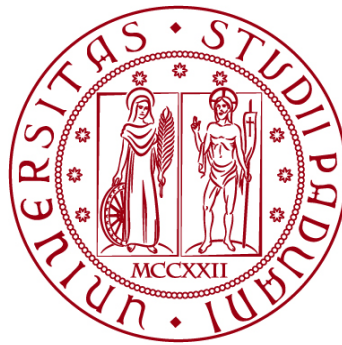


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

***Scaffold* derivati da matrice tumorale decellularizzata
di pazienti affetti da cancro del colon-retto
come modello 3D per lo studio
del microambiente metastatico del fegato**

Tutor: Prof.ssa Silvia Barbon
Dipartimento di Neuroscienze

Co-Tutor: Prof.ssa Elena Stocco
Dipartimento di Neuroscienze

Laureanda: Matilde Gallani

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT	Pag. 1
1. STATO DELL'ARTE	Pag. 2
1.1. Il cancro coloretale (<i>Colorectal Cancer, CRC</i>)	Pag. 2
1.1.1 Epidemiologia, eziologia e patogenesi.....	Pag. 2
1.1.2 Terapie attuali	Pag. 2
1.2. Metastasi epatiche del CRC	Pag. 3
1.3. Modelli in vitro per lo studio del microambiente tumorale	Pag. 4
1.3.1 Sistemi di coltura 2D convenzionale.....	Pag. 4
1.3.2 Sistemi di coltura 3D	Pag. 5
1.4. Scopo della tesi	Pag. 5
2. APPROCCIO SPERIMENTALE	Pag. 6
2.1. Pazienti.....	Pag. 6
2.2. Decellularizzazione dei tessuti	Pag. 7
2.3. Isolamento e quantificazione del DNA	Pag. 7
2.4. Istologia, immunoistochimica e immunofluorescenza	Pag. 7
2.5. Trasduzione lentivirale delle cellule CRC e selezione cellulare tramite FACS (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)	Pag. 8
2.6. Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM)	Pag. 8
2.7. Microscopia a Generazione di Seconda Armonica (SHG)	Pag. 8
2.8. Ricellularizzazione di <i>scaffold</i> decellularizzati e semina cellulare in inchiostro biostampabile in 3D	Pag. 8
2.9. Analisi di immagine in bioluminescenza	Pag. 9
2.10. Migrazione cellulare	Pag. 9
2.11. Trattamento con 5-fluorouracile e FOLFIRI e saggio di citotossicità	Pag. 10
2.12. Analisi statistica	Pag. 10
3. RISULTATI	Pag. 11
3.1. Decellularizzazione e caratterizzazione di <i>scaffold</i> 3D derivati da paziente.....	Pag. 11

3.2. Colonizzazione e proliferazione di cellule tumorali in <i>scaffold</i> CRC e CRLM	Pag. 12
3.3. Migrazione di cellule CRC in <i>scaffold</i> CRC e CRLM	Pag. 14
3.4. Fenotipo delle cellule CRC e analisi dell'induzione epitelio-mesenchimale	Pag. 15
3.5. Risposta terapeutica di <i>scaffold</i> HL e CRLM a differenti regimi di trattamento chemioterapico	Pag. 17
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag. 19
5. BIBLIOGRAFIA	Pag. 23

ABSTRACT

Il cancro del colon-retto (CRC) è il terzo tumore più diffuso al mondo ed il fegato è il più comune sito di metastasi; risulta, quindi, urgente la necessità di sviluppare nuovi modelli di coltura tissutale per studiare le metastasi epatiche del tumore (CRLM). La decellularizzazione fornisce un nuovo approccio per lo studio della matrice extracellulare (ECM) dei tessuti tumorali, poiché permette di mantenere le proprietà strutturali e biologiche del tessuto di partenza. Nel presente studio è stato realizzato un modello 3D di CRC/CRLM derivato da ECM coloretale ed epatica decellularizzata e poi ripopolata con cellule della linea HT-29. Le cellule hanno dimostrato una migliore capacità di proliferazione/migrazione quando coltivate su *scaffold* derivati da tessuti tumorali piuttosto che dai tessuti sani dello stesso paziente, regolando il profilo di espressione genica/proteica per realizzare una transizione epitelio-mesenchimale. Infine, le cellule HT-29 coltivate in microambienti 3D tumorali risultavano meno responsive al trattamento con agenti chemioterapici in confronto con sistemi di coltura 2D. In conclusione, il modello 3D di ECM decellularizzata di CRC/CRLM sembra mimare in modo migliore il microambiente metastatico rispetto alle condizioni di coltura 2D convenzionali, rappresentando un approccio promettente per lo studio di CRLM e la valutazione di agenti chemioterapici.

1. STATO DELL'ARTE

1.1. Il cancro coloretale (*Colorectal Cancer, CRC*)

1.1.1 *Epidemiologia, eziologia e patogenesi*

Il cancro coloretale (CRC) è il terzo tumore più comune al mondo, ed è classificato come la seconda causa di morte correlata al cancro (1,4 milioni di casi, 694.000 decessi, nel 2012) [1]. Il rischio di CRC aumenta con l'età: l'incidenza e la mortalità sono basse fino all'età di 45 anni e aumentano progressivamente fino ad un picco nella fascia d'età che va dagli 80 anni in poi [2]. Sia fattori genetici che fattori ambientali legati allo stile di vita svolgono un ruolo importante nell'eziologia del cancro coloretale. La maggior parte dei tumori coloretali è sporadica, circa tre quarti dei pazienti hanno una storia familiare negativa. Tuttavia, il rischio aumenta in caso di individui con un parente affetto da CRC. Un importante fattore genetico che comporta un aumento del rischio di sviluppo di CRC è la sindrome ereditaria del cancro coloretale. La sindrome di Lynch è la più comune, e al secondo posto si trova la poliposi adenomatosa familiare. Fattori ambientali come il consumo di alcol, il fumo, l'obesità e l'inattività fisica, il diabete mellito di tipo 2, e l'assunzione di carne rossa e lavorata influenzano il rischio di sviluppare il cancro del colon-retto. Al contrario, il consumo di latte, cereali integrali, frutta e verdura fresca, l'assunzione di calcio e vitamina D riducono il rischio. I fattori genetici e ambientali appena citati aumentano il rischio di CRC promuovendo l'acquisizione di comportamenti caratteristici del cancro, come instabilità e mutazioni del genoma, soppressione immunitaria nel microambiente tumorale, induzione all'angiogenesi e resistenza alla morte cellulare. Un modo in cui questi tratti caratteristici vengono acquisiti è attraverso l'accumulo progressivo di alterazioni genetiche ed epigenetiche, le quali attivano oncogeni e inattivano geni oncosoppressori. La perdita di stabilità genetica e/o epigenetica è stata osservata nella maggior parte delle lesioni neoplastiche precoci nel colon, ed è probabilmente un evento molecolare e pato-fisiologico centrale nella formazione del cancro coloretale, in quanto accelera l'accumulo di mutazioni e alterazioni epigenetiche nei geni oncosoppressori e negli oncogeni di cellule staminali risidenti nella base delle cripte del colon, le quali, secondo un paradigma diffuso, sono le cellule da cui originano la maggior parte dei tumori del colon-retto. Secondo questo modello, le mutazioni in queste cellule portano alla formazione di cellule staminali cancerose, essenziali per l'inizio e il mantenimento del tumore [3].

1.1.2 *Terapie attuali*

La maggior parte dei pazienti affetti da cancro coloretale non presenta sintomi clinici evidenti nella fase iniziale, con conseguente basso tasso di diagnosi precoce. Molti pazienti vengono diagnosticati in una fase avanzata, perdendo così la

possibilità di un trattamento radicale. Le attuali strategie terapeutiche per il trattamento del cancro coloretale comprendono la chirurgia (radicale o palliativa), abbinata con chemioterapia neoadiuvante per ridurre le dimensioni del tumore, o chemioterapia adiuvante, spesso combinata con la radioterapia, per eliminare le cellule tumorali residue e ridurre il rischio di recidiva; in caso di CRC in fase avanzata, si può eseguire una chemioterapia palliativa. I farmaci chemioterapici comunemente usati includono fluorouracile, irinotecan, oxaliplatino e raltitrexed, spesso usati in combinazione. Altri tipi di trattamenti si basano sulla terapia molecolare mirata e sull'immunoterapia. La terapia molecolare mirata si basa sull'uso di principalmente due farmaci a bersaglio molecolare, che sono quelli anti-angiogenesi, rappresentati dal bevacizumab, e quelli anti-fattore di crescita epidermico, rappresentati dal cetuximab. Per quanto riguarda l'immunoterapia, studi recenti hanno dimostrato che può prolungare la sopravvivenza nei pazienti con CRC [3].

1.2. Metastasi epatiche del CRC

Le metastasi sono la causa principale di morte nei pazienti con CRC, e il fegato ne è la sede più comune, poiché la maggior parte del drenaggio mesenterico intestinale entra nel sistema venoso portale epatico. Al momento della diagnosi, fino al 25% dei pazienti ha una metastasi epatica sincrona, e dopo la resezione del tumore primario, circa il 25% dei pazienti riceve una diagnosi di metastasi epatica entro i successivi 3 anni. Per spiegare perché il fegato sia un bersaglio principale delle metastasi del CRC, non ci si può limitare al fatto che in questo organo si localizza il primo letto capillare in cui le cellule CRC possono migrare, in quanto, secondo l'ipotesi del seme e del terreno, il luogo di formazione di metastasi dipende dalla compatibilità tra le cellule tumorali ("semi") e il microambiente di organi specifici ("terreno"). Il processo di formazione di una metastasi consiste in una serie di fasi sequenziali e interconnesse, ognuna delle quali può essere limitante, poiché un fallimento o un'insufficienza in una qualsiasi delle fasi, può arrestare la formazione di metastasi. Il processo comprende la sintesi e la secrezione di fattori angiogenici nel sito del tumore primario, così da stabilire una rete capillare nel tessuto circostante. Successivamente si ha l'invasione locale dello stroma ospite da parte di alcune cellule tumorali che, grazie a venule a parete sottile con una bassa resistenza alla penetrazione, entrano nella circolazione sanguigna o linfatica (intravasazione). Una volta in circolo, si verifica il distacco e l'embolizzazione di singole cellule tumorali o aggregati, la maggior parte delle quali viene rapidamente distrutta. Le cellule tumorali sopravvissute rimangono intrappolate nel letto capillare dell'organo sito della metastasi, aderendo alle cellule endoteliali o alla membrana basale sub-endoteliale. Successivamente si verifica l'extravasazione e la proliferazione all'interno del parenchima dell'organo,

che completa il processo metastatico [4]. Nella formazione di metastasi è essenziale sottolineare l'importanza della transizione epitelio-mesenchimale (*Epithelial–Mesenchymal Transition*, EMT), che è un processo biologico che consente alle cellule epiteliali di perdere la loro aderenza cellula-cellula e di acquisire proprietà mesenchimali, essenziali per l'invasione e la metastasi. Queste includono una maggiore mobilità, invasività, una maggiore resistenza all'apoptosi, e perdita di aderenza e polarità. Nel contesto di molti tumori epiteliali, incluso il CRC, questo processo avviene anche grazie alla *down*-regolazione di E-caderina, l'*up*-regolazione di Vimentina e la regolazione positiva dei geni *SNAI-1* e *ZEB-1*. L'E-caderina è una proteina essenziale nel mantenimento della polarità delle cellule epiteliali e nella stabilizzazione dei contatti cellula-cellula e la sua *down*-regolazione porta alla perdita di differenziazione epiteliale e all'acquisizione di un fenotipo mobile e invasivo. L'*up*-regolazione di Vimentina promuove la migrazione e l'invasività delle cellule cancerose, e la regolazione positiva dei geni *SNAI-1* e *ZEB-1* guida l'EMT e inibisce i componenti della polarità apicale-basale e le proteine di adesione come l'E-caderina [5].

1.3 Modelli *in vitro* per lo studio del microambiente tumorale

Nell'ambito della ricerca sul CRC, l'uso di modelli *in vitro* risulta particolarmente importante ai fini di replicare i meccanismi molecolari di progressione della malattia e la risposta al trattamento terapeutico. Tra questi modelli, le classiche colture cellulari 2D sono state per molti anni strumenti preziosi per scoprire aspetti funzionali chiave della biologia del CRC; tuttavia, queste linee cellulari mostrano una complessità ridotta rispetto ai tumori dei pazienti. Per questo di recente si stanno sviluppando studi sperimentali innovativi su modelli 3D (i.e., organoidi, matrici tissutali) che possiedono importanti segnali microambientali con un ruolo cruciale nella colonizzazione delle cellule cancerose e nel processo di metastasi.

1.3.1 Sistemi di coltura 2D convenzionale

Nell'impostazione 2D, le cellule vengono coltivate in adesione, come colture in monostrato, su supporti di coltura in polistirene. I principali vantaggi di questo metodo riguardano comodità e semplicità; le cellule, infatti, crescono adeguatamente, sono facili da mantenere e sono prive di contaminanti. In questo sistema, la manipolazione delle cellule, così come l'induzione o il silenziamento di una proteina, e il trattamento chemioterapico, sono relativamente semplici. D'altro canto, le cellule in 2D non crescono in un ambiente fisiologico che consenta loro di assumere le diverse forme e i comportamenti osservati *in vivo*, perché sono costrette a polarizzare e ad aumentare la loro area di scambio con i terreni di coltura a causa dell'attaccamento a substrati rigidi e piani. Questo comporta una sovra-nutrizione, sovra-ossigenazione e non riproducibilità dei gradienti

molecolari effettivamente presenti *in vivo*. Inoltre, nei modelli 2D la composizione, la configurazione e la produzione di matrice extracellulare (*Extracellular Matrix*, ECM) sono significativamente alterate. Ciò pone una limitazione rilevante nell'uso di colture 2D per i test sui farmaci antitumorali, i quali raggiungono le cellule senza alcuna barriera fisica, con conseguente sovraesposizione. Questo modello colturale ha contribuito notevolmente alla conoscenza della biologia del tumore, tuttavia non è in grado di rappresentare la vera e complessa architettura tumorale.

1.3.2 Sistemi di coltura 3D

Il sistema di coltura 3D rappresenta un nuovo approccio di modellizzazione *in vitro* del microambiente tumorale per superare i limiti della coltura 2D. I modelli 3D sono in grado di ricapitolare alcune caratteristiche dei tessuti tumorali solidi, come la morfologia del tumore, la distribuzione del gradiente di sostanze chimiche e fattori biologici, le interazioni o vincoli reciproci tra tumore e il suo stroma. I modelli 3D si dividono in modelli senza *scaffold* (sferoidi, organoidi, tumoroidi) e con *scaffold* (naturali o sintetici). Gli *scaffold* sono strutture di supporto progettate per migliorare l'adesione, la crescita, il differenziamento e la migrazione delle cellule rispetto alle colture 2D. Tra i sistemi di coltura 3D, è inclusa la creazione di *scaffold* derivati da matrice decellularizzata. La decellularizzazione dei tessuti è un processo che consente la rimozione delle cellule di origine usando metodi chimici, fisici o enzimatici, senza alterare la struttura e la composizione molecolare dell'ECM. L'uso di *scaffold* decellularizzati offre un vantaggio significativo, poiché una parte delle principali proteine strutturali e dei fattori solubili sono già presenti nell'impalcatura decellularizzata, creando un ambiente più simile a quello presente *in vivo*. Lo studio di ECM decellularizzata da tessuto tumorale può, quindi, aiutare a capire il ruolo complesso e fondamentale della matrice nella progressione della malattia e nella formazione di metastasi, in quanto permette di ricapitolare il microambiente tumorale e metastatico, consentendo alle cellule di comportarsi in modo simile a come farebbero *in vivo*.

1.4 Scopo della tesi

Questo lavoro di tesi presenta l'articolo di D'Angelo e colleghi [6], che si propone di realizzare modelli 3D di CRC e del microambiente metastatico epatico (*Colorectal Cancer Liver Metastasis*, CRLM) utilizzando la matrice extracellulare (ECM) ottenuta tramite la decellularizzazione di tessuti derivati da pazienti oncologici e seminata con la linea cellulare HT-29. L'obiettivo è quello di generare *scaffold* biomimetici senza alterare le proprietà biologiche e strutturali dell'ECM, che possano essere usati come modello 3D capace di imitare le proprietà fenotipiche e biologiche del microambiente metastatico del CRC che si riscontra *in vivo*.

2. APPROCCIO SPERIMENTALE

2.1 Pazienti

Campioni di mucosa di colon sano (*Healthy Colon*, HC), cancro coloretale primario (*Colorectal Cancer*, CRC) fegato sano (*Healthy Liver*, HL) e metastasi al fegato provenienti da tumore del colon-retto (*Colorectal Cancer Liver Metastasis*, CRLM) sono stati prelevati da pazienti sottoposti a intervento curativo tra gennaio 2016 e luglio 2019 presso la Clinica Chirurgica 1 (Dipartimento di Chirurgia, Oncologia e Gastroenterologia, Università di Padova, Padova, Italia) e presso l'Unità di Chirurgia Generale, Ospedale di S. Antonio (Padova, Italia) o da pazienti sottoposti a epatectomia parziale come parte del regime di trattamento da novembre 2017 a novembre 2018 presso il King's College Hospital (Londra, Regno Unito). In particolare, campioni di HC, CRC, HL e CRLM sono stati prelevati - tutti dallo stesso paziente - da 5 soggetti affetti da CRC, mentre altri campioni di HL e CRLM sono stati prelevati da ulteriori 13 pazienti oncologici con metastasi epatiche (Tabella 1).

Characteristic	Parameter	CRLM Patients (n = 18)
Age	Median (range), yrs	65 (45–87)
Sex	Male	7 (39.9%)
	Female	11 (61.1%)
cTNM	IV	18 (100%)
Metastasis onset	Synchronous	10 (55.6%)
	Metachronous	4 (22.2%)
	Not-available	4 (22.2%)

Characteristic	Parameter	CRC Patients (n = 5)
Age	Median (range), yrs	62 (54–81)
Sex	Male	4 (80%)
	Female	1 (20%)
Grade	1	1 (20%)
	2	4 (80%)
	3	0 (0%)
cTNM	I	0 (0%)
	II	0 (0%)
	III	1 (20%)
	IV	4 (80%)

Tabella 1. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti CRLM e CRC.
Yrs: anni; cTNM: stadio clinico delle metastasi dei linfonodi tumorali.

Questo studio è stato condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki, dopo aver ottenuto il consenso informato dai singoli pazienti. I comitati etici delle Istituzioni hanno approvato il protocollo di studio (Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova, Protocollo n. P448 e *King's College Hospital Health Research Authority*, approvazione del "Research Ethics Committee", ref: 17/NE/0340). Tutti i pazienti arruolati soddisfacevano i criteri di inclusione (i.e., adenocarcinoma primario del colon confermato istologicamente e/o metastasi

epatica sincrona/metacrona, età >18 anni). Sono stati esclusi i pazienti con una storia nota di cancro coloretale ereditario e quelli sottoposti a trattamenti neoadiuvanti. Sono stati arruolati in totale 18 pazienti CRLM e 5 pazienti CRC.

2.2 Decellularizzazione dei tessuti

I tessuti CRC e CRLM sono stati prelevati dal margine della neoplasia infiltrante. I campioni HC comprendevano la superficie luminale, la mucosa e la sottomucosa e sono stati ottenuti a più di 10 cm di distanza dal CRC primario. I campioni HL sono stati raccolti ad almeno 0,5 cm di distanza dal margine metastatico. Tutti i campioni raccolti chirurgicamente sono stati conservati in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) fredda e sterile per non più di 2 ore (h) prima della processazione. I tessuti HC, CRC, HL e CRLM destinati al gruppo di pre-decellularizzazione sono stati risciacquati con PBS sterile e successivamente processati/analizzati secondo metodologie specifiche.

I campioni destinati alla decellularizzazione sono stati sottoposti a 1-3 cicli del trattamento detergente-enzimatico (*Detergent - Enzymatic Treatment*, DET) descritto da Piccoli e colleghi [7]. In breve, ogni ciclo DET consisteva nell'incubazione dei tessuti in i) acqua deionizzata a 4 °C per 24 h, ii) 4% di sodio desossicolato (SDS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) a temperatura ambiente (TA) per 4 h e iii) 2.000 kU di DNasi-I (Sigma-Aldrich) in 1 M NaCl (Sigma-Aldrich) a TA per 3 h, dopo un lavaggio in acqua. In seguito al trattamento di decellularizzazione, le matrici sono state lavate per almeno 3 giorni in acqua sterile deionizzata.

2.3 Isolamento e quantificazione del DNA

Per valutare il contenuto totale di DNA nei campioni HL e CRLM pre-decellularizzazione e confrontare i valori con le loro controparti DET, 20 mg di tessuto sono stati elaborati utilizzando il kit *DNeasy Blood&Tissue* (Qiagen, Hilden, Germania). I campioni di DNA sono stati quantificati usando lo spettrofotometro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Waltham, MA, USA).

2.4 Istologia, immunoistochimica e immunofluorescenza

Sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina (spessore: 8 µm) sono state sottoposte ad analisi istologiche tramite colorazione con ematossilina ed eosina (H&E; Bio Optica, Milano, Italia), colorazione tricromica di Masson (MT) (kit con blu di anilina, Bio Optica), colorazione Alcian blu (pH 2.5, kit Bio Optica), colorazione tricromica di Van Gieson (Bio Optica), colorazione con argento (Bio Optica) e colorazione con acido periodico di Schiff (PAS; Bio Optica). Inoltre, le sezioni sono state indagate per l'immunolocalizzazione di target specifici tramite la marcatura con i seguenti anticorpi primari: laminina (Sigma-Aldrich), HIF-1alfa,

collagene IV (Dako), Ki-67 (Abcam), E-caderina (Abcam), Caspasi-3 attivata (Cell Signaling) e Vimentina (Abcam). L'analisi immunoistochimica è stata eseguita in modo automatizzato utilizzando il kit *Bond Polymer Refine Detection* (Leica Biosystems, Wetzlar, Germania) nel sistema BOND-MAX (Leica Biosystems). L'immunofluorescenza è stata eseguita utilizzando protocolli precedentemente standardizzati [7] e come specificato nei *Materiali Supplementari* dell'articolo di D'Angelo e collaboratori [6], anche per quanto riguarda gli anticorpi e le diluizioni utilizzati (Tabella S3 in D'Angelo et al., 2020 [6]). Come controllo, l'immunofluorescenza è stata eseguita su cellule HT-29 e HCT-116 coltivate in 2D (rispettivamente, Figure S3 e S4 in D'Angelo et al., 2020 [6]).

2.5 Trasduzione lentivirale delle cellule CRC e selezione cellulare tramite FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Il vettore lentivirale pHIV-Luc-ZsGreen è stato fornito dal Dott. Bryan Welm (Dipartimento di Chirurgia, Università dello Utah, acquistato da Addgene Inc. MA, USA, Plasmide n. 39196) ed è stato utilizzato per generare lentivirus che esprimevano sia la proteina fluorescente ZsGreen che la luciferasi di lucciola tramite un sito IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) sotto il promotore EF1-alfa. Il protocollo di trasduzione è riportato nei *Materiali Supplementari* in D'Angelo et al., 2020 [6].

2.6 Analisi di microscopia elettronica a scansione (SEM)

I campioni sono stati tagliati in frammenti di circa 0,5 cm² e fissati con glutaraldeide al 3% in PBS 0,1 M. Dopo la fissazione e il lavaggio con PBS 1X, i campioni sono stati disidratati in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo in acqua dal 15% al 100% di alcol, sottoposti a *critical point drying* utilizzando CO₂ e infine montati su supporti di alluminio utilizzando carbone adesivo. I campioni sono stati montati e rivestiti con uno strato sottile di Au/Pd (Oro/Palladio) (spessore di circa 2 nm) utilizzando il sistema *Gatan ion beam coater*. Le immagini sono state acquisite con un microscopio elettronico a scansione JEOL JS; 6490 (North Billerica, MA, USA).

2.7 Microscopia a Generazione di Seconda Armonica (SHG)

L'analisi di microscopia SHG è stata effettuata utilizzando un microscopio multimodale personalizzato, descritto in dettaglio nei *Materiali Supplementari* in D'Angelo et al., 2020 [6].

2.8 Ricellularizzazione di scaffold decellularizzati e semina cellulare in inchiostro biostampabile in 3D

Le matrici decellularizzate HC, CRC, HL e CRLM sono state incubate *overnight* con un terreno di coltura contenente antibiotico primocina (InvivoGen) a 37°C. Per

normalizzare la variabilità intra-campione, gli *scaffold* sono stati tagliati in dimensioni comparabili prima della semina. Tutte le matrici sono state quindi iniettate con $2,5 \times 10^5$ cellule HT-29 ZsGreen/Luc+ o HTC-116, risospese in 10 μL di collagene I (diluito 2:3 con RPMI-1640), utilizzando un ago da siringa da 30G in una piastra *multiwell* da 24 pozzetti. Parallelamente, una goccia di 100 μL di inchiostro biostampabile in 3D (Bioink—CELLINK Company, Svezia) è stata miscelata con $2,5 \times 10^5$ cellule HT-29 ZsGreen/Luc+ e depositata in una *multiwell* da 24 pozzetti. I campioni sono stati incubati per 6 h in un incubatore umidificato a 37°C e 5% di CO₂. Il terreno completo (*Materiali Supplementari* in D'Angelo et al., 2020 [6]) è stato aggiunto e cambiato a giorni alterni. I campioni ricellularizzati utilizzati per l'estrazione dell'RNA sono stati immediatamente congelati in azoto liquido alla fine dell'esperimento e conservati a -80°C. I campioni ricellularizzati usati per le analisi istologiche/immunoistochimiche invece, sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina o fissati in PFA al 4% e inclusi in OCT o gelatina-saccarosio.

2.9 Analisi di immagine in bioluminescenza

Il gene della luciferasi nel lentivirus consente la visualizzazione delle cellule tramite bioluminescenza in presenza di substrato D-luciferina (Cayman Chemicals, Regno Unito). Per standardizzare la rilevazione della bioluminescenza, le cellule HT-29 sono state seminate in piastre *multiwell* da 24 pozzetti e incubate con concentrazioni crescenti di D-luciferina (da 1 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). È stata eseguita un'analisi dell'andamento temporale della bioluminescenza a tutte le concentrazioni di D-luciferina utilizzando il solo terreno di coltura come controllo negativo. Il segnale di bioluminescenza è stato misurato ogni 5 minuti (min), fino a 60 min, dopo l'aggiunta di D-luciferina, utilizzando il sistema di *imaging in vivo* IVIS Lumina III (IVIS) e il software Living Image 3.2 (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA). Ulteriori dettagli sono descritti nei *Materiali Supplementari* in D'Angelo et al., 2020 [6].

2.10 Migrazione cellulare

È stata condotta un'indagine sulla migrazione cellulare negli *scaffold* 3D decellularizzati iniettando cellule HT-29 in corrispondenza del lato sinistro degli *scaffold* e coltivandole per 4 giorni (gg). La bioluminescenza è stata rilevata ogni 24 h. Le analisi quantitative della migrazione cellulare sono state ottenute misurando la bioluminescenza in quattro campi dell'immagine (*Region of Interest*, ROI) in sequenza (da sinistra a destra) per identificare la distanza percorsa dalle cellule all'interno degli *scaffold*. Il *fold increase* nella radianza media all'estremità più a destra degli *scaffold* (ROI d) al giorno 4 rispetto al giorno 0 è stato determinato come la distanza massima percorsa dalle cellule. La migrazione negli

scaffold seminati è stata poi confermata qualitativamente mediante colorazione H&E.

2.11 Trattamento con 5-fluorouracile e FOLFIRI e saggio di citotossicità

Per il trattamento con 5-fluorouracile (5-FU) e 5-FU combinato con irinotecan (FOLFIRI) nell'impostazione del modello 3D, gli *scaffold* HL e CRLM sono stati seminati con $2,5 \times 10^5$ cellule CRC in piastre *multiwell* da 24 pozzetti. Cinque giorni dopo la semina, le cellule sono state trattate con $1 \mu\text{M}$ di 5-FU o FOLFIRI (sia 5-FU che irinotecan a $1 \mu\text{M}$) per 72 h. Per il trattamento con 5-FU della coltura 2D, 5-FU o FOLFIRI sono stati aggiunti dopo 5 gg di coltura. Le cellule HT-29 sono state seminate a 2×10^4 cellule per pozzetto in piastre *multiwell* da 24 pozzetti. La vitalità cellulare è stata determinata mediante lettura della bioluminescenza con IVIS ai gg 0, 1, 3, 5, 6, 7 e 8 e la luciferina è stata aggiunta fresca ogni volta. Durante le 72 h di trattamento, 5-FU o FOLFIRI sono stati aggiunti solo una volta (giorno 5).

2.12 Analisi statistica

Tutti i grafici e le analisi statistiche sono stati eseguiti utilizzando il software GraphPad (versione 6, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I dati sono espressi come medie \pm SEM. Per il confronto tra gruppi sperimentali accoppiati, sono stati utilizzati test di *t* Student bilaterali (per il set di dati parametrico) e il test di Mann-Whitney (per il set di dati non parametrico). Sono stati eseguiti ANOVA unidirezionale con post-test di Bonferroni (per il set di dati parametrico) e test di Kruskal-Wallis con post-test di Dunn (per il set di dati non parametrico) per confronti multipli. Un *p*-value $< 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo (* *p*-value $< 0,05$; ** *p*-value $< 0,01$; *** *p*-value $< 0,001$).

3. RISULTATI

3.1 Decellularizzazione e caratterizzazione di *scaffold* 3D derivati da paziente

Dopo il trattamento detergente-enzimatico (DET), sia i campioni HL che i campioni CRLM hanno mantenuto un aspetto fenotipico simile alla controparte pre-DET, senza degradazione o disintegrazione evidenti. Il tessuto CRLM post-DET appariva più traslucido rispetto al tessuto fresco, mentre il tessuto HL post-DET ha mantenuto un colore marrone (Figura 1A). L'analisi al SEM e la colorazione DAPI hanno confermato l'efficace deplezione della componente cellulare ed il mantenimento dell'ultrastruttura dopo il processo della decellularizzazione (Figura 1B). La quantificazione del DNA dopo ogni ciclo DET ha confermato che i campioni HL e CRLM sono stati decellularizzati con successo dopo due cicli DET, con una riduzione del contenuto di DNA rispettivamente del 95,3% ($p = 0,0032$) e del 95,42% ($p = 0,0032$), in confronto ai tessuti nativi pre-DET (Figura 1C). L'assenza di elementi cellulari nei tessuti HL e CRLM post-DET è stata confermata con la colorazione H&E (Figura 1D).

L'analisi istologica/immunoistochimica ha mostrato che l'espressione e la distribuzione dei componenti chiave dell'ECM (i.e., collagene, glicosamminoglicani) sono stati mantenuti nei tessuti HL e CRLM post-DET. Le colorazioni MT e di Van Gieson hanno rivelato la conservazione delle strutture del collagene attraverso gli spazi portali e le pareti dei vasi dopo la decellularizzazione, ma hanno sottolineato l'assenza di fibre collagene lineari nello spazio parenchimale del tessuto CRLM pre- e post-DET rispetto al tessuto HL (Figura 1D e Figura S1 [6]), come dimostrato anche dall'immunolocalizzazione del collagene IV (Figura S1 [6]). Al contrario, la colorazione con argento per le fibre di reticolina ha evidenziato nei tessuti nativi un'espansione iperplastica dello spazio di Disse comunemente osservata in condizioni rigenerative e neoplastiche (Figura 1D); queste caratteristiche sono state mantenute nei campioni decellularizzati. La colorazione Alcian Blu ha mostrato una minore presenza di mucine acide, colorate in blu, nei tessuti HL sia pre- che post-DET (Figura 1D). La colorazione PAS delle mucine neutre e del glicogeno in viola-magenta ha mostrato un contenuto di glicogeno ridotto nei tessuti HL post-DET rispetto alla controparte pre-DET, evidenziando che questa componente è sensibile al trattamento di decellularizzazione. Nei campioni CRLM pre- e post-DET è stata rilevata una sovrapproduzione di mucine acide evidenziata dalla colorazione Alcian Blu e generalmente osservata nell'evoluzione patologica del CRC; tale sovrapproduzione era, invece, assente nei campioni HL. Nel complesso, questi risultati hanno confermato che il metodo di decellularizzazione è stato in grado di rimuovere le cellule residenti preservando le proprietà biochimiche e strutturali dell'ECM epatica sia sana che metastatica.

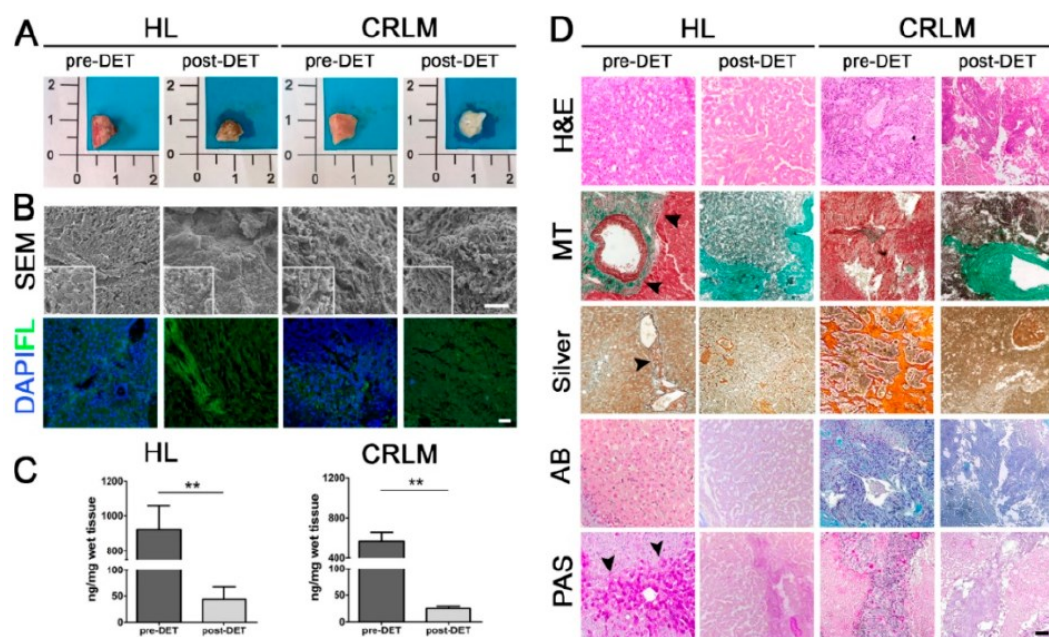


Figura 1. Decellularizzazione e caratterizzazione di *scaffold* decellularizzati derivati da pazienti con metastasi epatiche da cancro coloretale. **(A)** Aspetto macroscopico di campioni di tessuto epatico sano (HL) e di metastasi epatiche da cancro coloretale (CRLM), prima (pre-trattamento detergente-enzimatico, DET) e dopo (post-DET) due cicli di decellularizzazione. **(B)** Analisi SEM e di immunofluorescenza di biopsie fresche e decellularizzate di HL e CRLM. DAPI: 4',6-diamidin-2-fenilindolo (blu); FL: autofluorescenza dei campioni di tessuto per mostrare la conservazione del tessuto (verde). *Scale bar:* 100 μ m. **(C)** Quantificazione del DNA dei campioni di tessuto prima e dopo la decellularizzazione; $n = 3$. P -value $< 0,01$ mediante test t di Student. **(D)** Colorazione istologica dei campioni HL e CRLM pre-DET e post-DET. H&E: Ematossilina ed Eosina; MT: Tricromica di Masson, con collageni fibrillari indicati dalle frecce; AB: Alcian Blu; PAS: Acido periodico di Schiff, con glicogeno indicato dalle frecce. *Scale bar:* 100 μ m.

3.2 Colonizzazione e proliferazione di cellule tumorali in *scaffold* CRC e CRLM

Per verificare se gli *scaffold* decellularizzati derivati dai pazienti CRC e CRLM potessero sostenere la vitalità cellulare in modo tessuto-specifico, le cellule HT-29 Luc-ZsGreen⁺ (Figura S2 [6]) sono state coltivate in *scaffold* CRC e CRLM, utilizzando i rispettivi campioni sani come controllo. Le cellule HT-29 sono risultate capaci di aderire e colonizzare tutti e quattro i tipi di *scaffold*, come dimostrato dall'analisi della bioluminescenza, sebbene siano state rilevate attività metaboliche significativamente diverse tra i campioni di tessuto (Figura 2A).

Negli *scaffold* CRC, le cellule HT-29 hanno dimostrato una vitalità cellulare significativamente più elevata rispetto ai supporti HC nei primi 4 gg di coltura ($p = 0.011$ al giorno 2, $p = 0,0017$ al giorno 3, $p = 0,00023$ al giorno 4) (Figura 2B). Le cellule seminate in *scaffold* HL e CRLM hanno mostrato una differenza iniziale nel tasso di vitalità, significativamente più alto nei secondi che nei primi al giorno 3 ($p = 0,034$) e, successivamente, una tendenza simile è stata esibita fino a 10 gg di coltura (Figura 2C). La capacità delle cellule di aderire e crescere negli *scaffold* decellularizzati è stata confermata tramite colorazione delle sezioni con H&E al

giorno 10 di coltura. Sono stati identificati cluster di cellule di diverse dimensioni all'interno degli *scaffold* (Figura 2D).

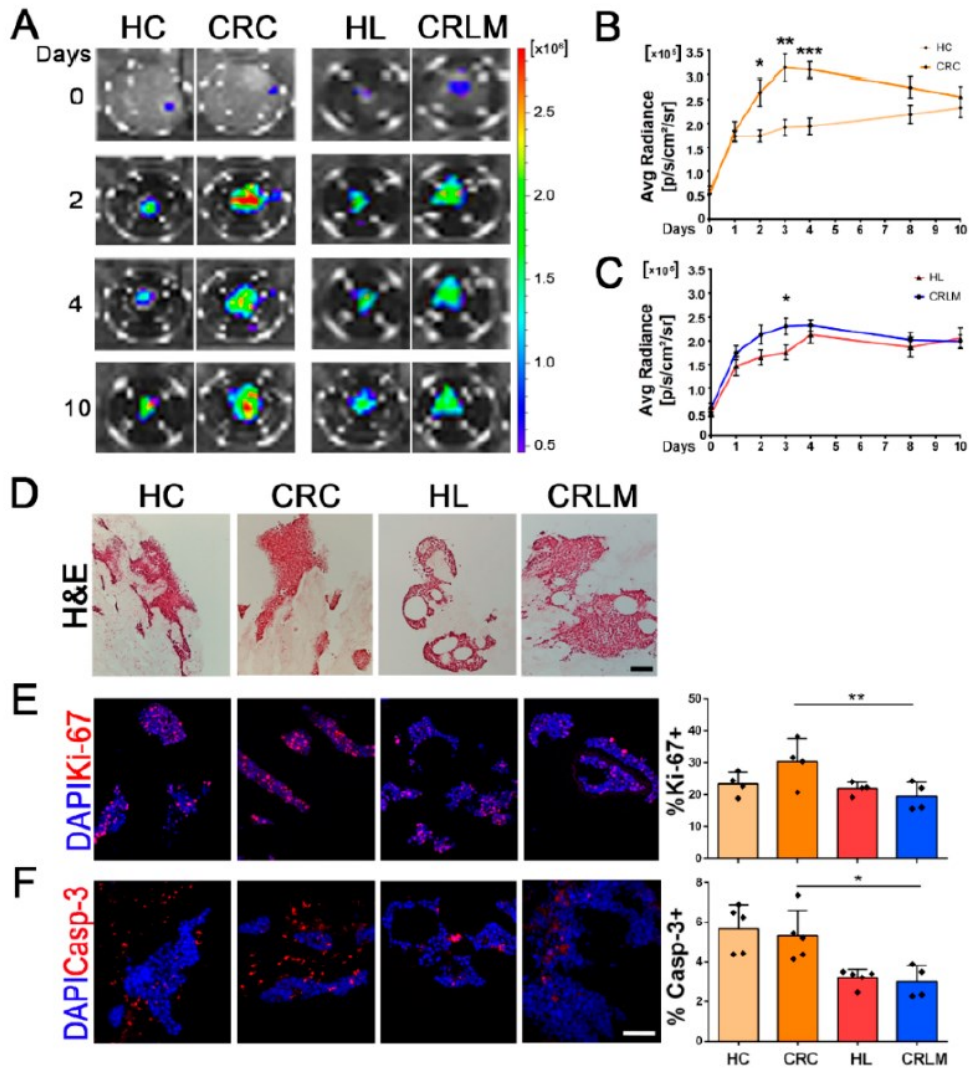


Figura 2. Caratterizzazione di *scaffold* CRC e CRLM ricellularizzati, utilizzando IVIS e immunofluorescenza. **(A)** Immagini rappresentative di bioluminescenza mostrano il tasso di proliferazione delle cellule HT-29 Luc-ZsGreen⁺ seminate in *scaffold* decellularizzati sani (HC e HL) e neoplastici (CRC e CRLM) dal giorno 0 al giorno 10. **(B)** I grafici lineari riassumono il tasso di proliferazione dei campioni CRC ricellularizzati con cellule HT-29 rispetto ai tessuti HC (HC, $n = 4$; CRC, $n = 4$) e **(C)** CRLM rispetto a HL (HL, $n = 4$; CRLM, $n = 4$). **(D)** Immagini H&E rappresentative di *scaffold* 3D sani e neoplastici 10 gg dopo la ricellularizzazione con cellule HT-29. Immagini di immunofluorescenza e quantificazioni di **(E)** Ki-67⁺ e **(F)** Caspasi-3⁺ a 10 gg dalla semina; i nuclei sono stati controcolorati con DAPI (blu). Scale bar: 50 μ m. Per i grafici lineari, * p -value < 0,05; ** p -value < 0,01; e *** p -value < 0,001 mediante test di t di Student. Per l'istogramma, * p -value > 0,05 e ** p -value < 0,01 mediante un test ANOVA unidirezionale, seguito dal test di confronto multiplo di Tukey.

Rispetto alla coltura convenzionale 2D (Figura S3 [6]), la proliferazione si è ridotta nelle condizioni di coltura 3D al giorno 10 di coltura (*end point*), come evidenziato dall'analisi di immunofluorescenza per il marcatore Ki-67 (Figura 2E). Tra gli *scaffold* seminati, è stato osservato un numero relativo di cellule Ki-67⁺ più elevato nelle matrici CRC rispetto a tutti gli altri campioni ($p = 0,044$), senza alcuna differenza significativa tra gli *scaffold* HC, HL e CRLM, corroborando i dati di

bioluminescenza. L'analisi dell'immunofluorescenza per la Caspasi-3 attivata ha mostrato un tasso di apoptosi significativamente più elevato in entrambi gli *scaffold* derivati dal colon (HC e CRC) rispetto ai campioni derivati dal fegato (sia HL che CRLM) ($p = 0,016$) (Figura 2F). Una tendenza simile, sebbene non significativa, è stata osservata negli *scaffold* ripopolati con una diversa linea cellulare di CRC. In particolare, gli *scaffold* CRC ripopolati con HTC-116 hanno mostrato una percentuale maggiore di cellule Ki-67⁺ rispetto agli *scaffold* HL e CRLM. I numeri relativi di cellule Caspasi-3⁺ erano comparabili tra gli *scaffold* ripopolati con HT-29 e HTC-116 (rispettivamente, Figura 2F e Figura S4 [6]).

3.3 Migrazione di cellule CRC in *scaffold* CRC e CRLM

L'indagine sulla migrazione cellulare negli *scaffold* 3D ha mostrato che le cellule HT-29 iniettate nel lato sinistro dei supporti (ROI a) e coltivate per 4 gg, migravano verso l'estremità destra (ROI d) (Figura 3A-C). Le cellule HT-29 seminate in *scaffold* di tessuto sano (sia HC che HL) hanno mostrato una capacità di migrazione simile tra loro ed inferiore rispetto agli *scaffold* derivati da tumore. I campioni CRLM ricellularizzati hanno mostrato un potenziale di migrazione significativamente più elevato rispetto a quelli HL ($p = 0,018$) e una tendenza simile rispetto agli *scaffold* CRC (Figura 3B). Le cellule negli *scaffold* HC hanno mostrato una distribuzione attorno al sito di peri-iniezione (evidenziata con una linea nera), mentre è stata osservata un'attitudine alla migrazione più marcata nei campioni CRLM e CRC precedentemente seminati (Figura 3C). Poiché un buon equilibrio tra la linearizzazione delle fibre di collagene e l'abbondanza di collagene reticolare è cruciale per l'extravasazione e la migrazione delle cellule metastatiche [8], è stato anche analizzato il parenchima degli *scaffold* CRC e CRLM. È stato rilevato un basso contenuto di collagene lineare, ovvero collagene IV (Figura 3D), ma un'elevata densità di fibre reticolari e altri componenti proteici associati all'ECM nello stroma CRLM, come evidenziato dalla colorazione H&E (Figura 3C) e dall'*imaging* SHG (Figura 3D).

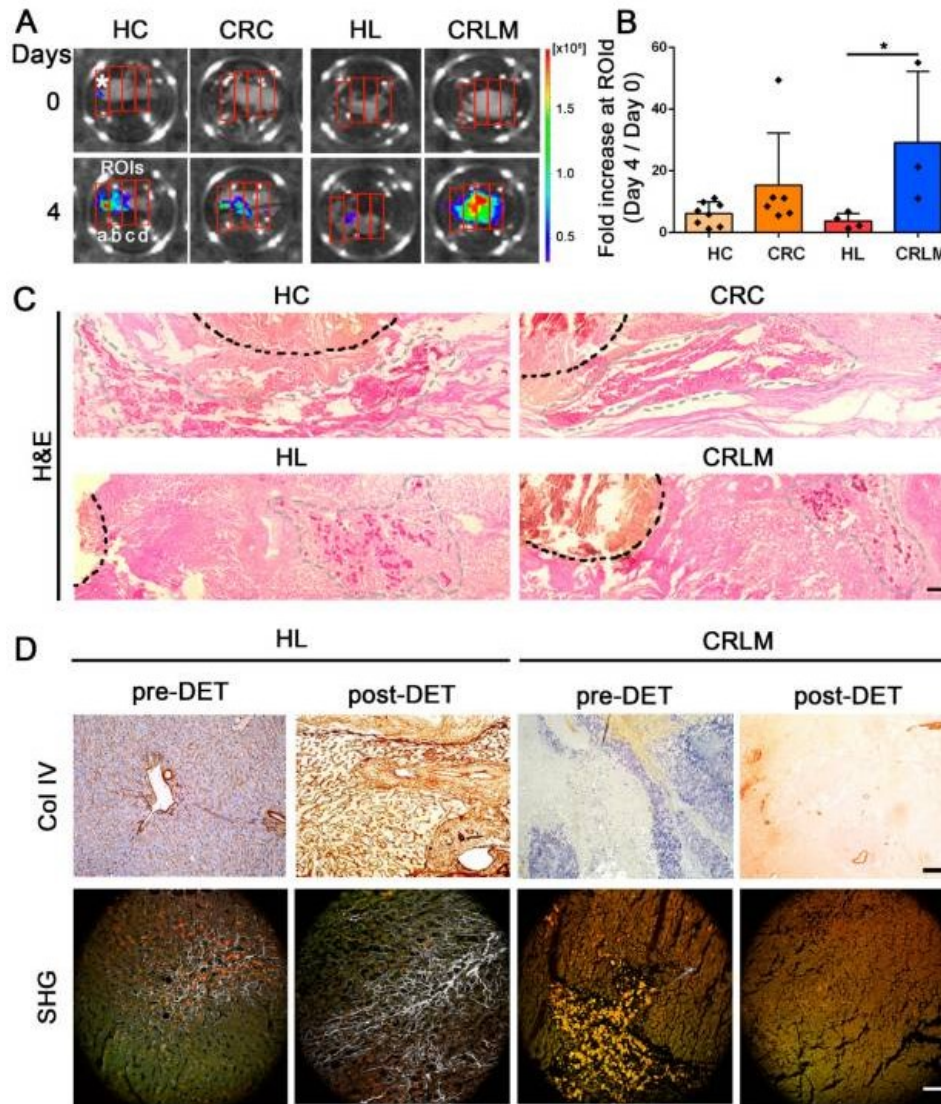


Figura 3. Analisi della migrazione cellulare in *scaffold* CRC e CRLM ricellularizzati e distribuzione del collagene. **(A)** Immagini rappresentative di bioluminescenza mostrano il tasso di migrazione delle cellule HT-29 seminate in *scaffold* decellularizzati sani (HC e HL) e neoplastici (CRC e CRLM) dal giorno 0 al giorno 4. Asterisco: punto di iniezione delle cellule HT-29. a, b, c, d e rettangoli rossi: regioni di interesse (ROI). **(B)** L'istogramma riassume il tasso di migrazione degli *scaffold* ricellularizzati con cellule HT-29 (HC, $n=3$; CRC, $n=3$; HL, $n=4$; CRLM, $n=3$). La migrazione cellulare è stata calcolata come il *fold increase* nella ROI d tra il giorno 0 e il giorno 4. **(C)** Le immagini H&E rappresentative al giorno 4 mostrano il sito di iniezione delle cellule HT-29 in ogni *scaffold* (linea tratteggiata nera) e la capacità di migrazione cellulare differenziale (fronte di migrazione evidenziato con una linea tratteggiata grigia). *Scale bar*: 100 μm . **(D)** In alto: immunolocalizzazione di collagene IV (Col IV) in campioni di tessuto HL e CRLM normali (pre-DET) e decellularizzati (post-DET). *Scale bar*: 100 μm . In basso: immagini SHG di campioni di tessuto HL e CRLM pre-DET e post-DET. Il collagene I nelle immagini SHG è evidenziato in bianco, i nuclei in arancione chiaro e i granuli di lipofuscina in arancione scuro. *Scale bar*: 100 μm . * p -value < 0,05, tramite un test ANOVA unidirezionale, seguito dal test di confronto multiplo di Tukey.

3.4 Fenotipo delle cellule CRC e analisi dell'induzione epitelio-mesenchimale

Dato il differente comportamento cellulare tra le colture 3D, è stato studiato il profilo EMT delle cellule tumorali. L'analisi dell'immunofluorescenza ha mostrato una significativa riduzione dell'espressione di E-caderina quando le cellule HT-29 sono state coltivate in *scaffold* CRLM rispetto ai campioni HL e CRC ($p < 0,001$ e p

< 0,0001, rispettivamente) (Figura 4A), mentre hanno mostrato un'espressione significativamente aumentata di Vimentina solo quando coltivate in *scaffold* CRLM, rispetto ai campioni CRC e ad entrambi gli *scaffold* sani ($p < 0,001$ vs. CRC; $p < 0,001$ vs. HL e $p = 0,001$ vs. HC) (Figura 4B). Negli *scaffold* ripopolati con HTC-116, le proteine E-caderina e Vimentina hanno mostrato un'abbondanza omogenea in tutti i campioni. A livello trascrittomico, non sono state osservate differenze significative nell'espressione genica di E-caderina e Vimentina (Figura S4 [6]). Inoltre, le cellule HT-29 hanno mostrato una significativa *up*-regolazione dei geni *SNAI-1* e *ZEB-1* negli *scaffold* CRLM rispetto alle condizioni di coltura 2D ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, rispettivamente) (Figura 4 C, D). Quando le cellule sono state coltivate in condizioni 3D ma senza la presenza di ECM (con inchiostro biostampabile in 3D), hanno mostrato un pattern di espressione genica di *SNAI-1* e *ZEB-1* che appariva intermedio tra quello rilevato negli *scaffold* 3D e quello osservato nelle colture convenzionali in 2D (Figura 4 C, D e Figura S5 [6]). Confrontando le cellule HT-29 coltivate con bioinchiostro 3D con le colture 2D convenzionali, il livello di espressione di E-caderina è leggermente diminuito nelle condizioni 3D, mentre la Vimentina risulta completamente assente nelle condizioni di bioinchiostro 3D e ad un basso livello basale nelle colture 2D (Figura S3 e Figura S5 [6]).

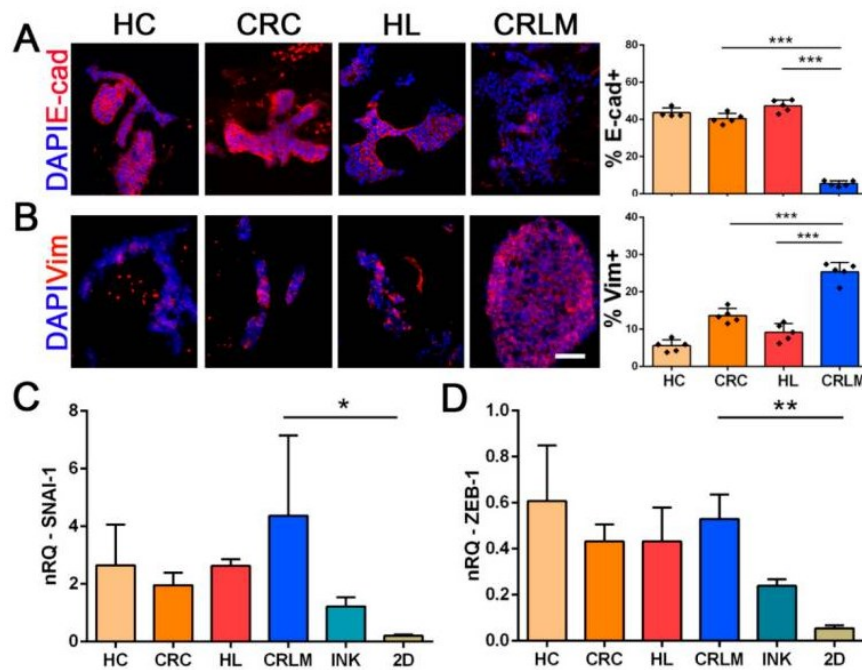


Figura 4. Profilo fenotipico e molecolare dei marcatori EMT in *scaffold* ricellularizzati in confronto a cellule HT-29 coltivate in 2D. Immagini di immunofluorescenza e quantificazione al giorno 10 di (A) E-caderina⁺ e (B) Vimentina⁺; i nuclei sono stati controcolorati con DAPI (blu). (C) e (D) Livello di espressione genica, dopo 10 gg di coltura, rispettivamente di *SNAI-1* e *ZEB-1* in cellule HT-29 ZsGreen/Luc⁺ seminate in HC, CRC, HL, CRLM, inchiostro biostampabile in 3D (INK) e in una piastra di plastica convenzionale (2D). Scale bar: 50 μ m. Nrq = quantità relativa normalizzata per i dati di qRT-PCR. Per l'istogramma, * p -value < 0,05; ** p -value < 0,01; e *** p -value < 0,001 mediante test ANOVA unidirezionale, seguito dal test di confronto multiplo di Tukey.

Negli *scaffold* ripopolati con cellule HCT-116, non è stata osservata alcuna differenza nell'espressione del gene *SNAI-1* tra i diversi campioni, sebbene fosse significativamente più alta rispetto alle colture cellulari 2D (Figura S4 [6]). È stata anche osservata una regolazione positiva del gene *ZEB-1* solo quando le cellule venivano coltivate in *scaffold* CRLM (CRLM vs. 2D, $p < 0,001$ e CRLM vs. HL, $p < 0,05$) (Figura S4 [6]).

3.5 Risposta terapeutica di *scaffold* HL e CRLM a differenti regimi di trattamento chemioterapico

Per valutare se il modello 3D di CRLM possa essere considerato un valido test *in vitro* per lo screening di farmaci chemioterapici, la citotossicità e la prognosi, sono stati condotti studi sugli effetti del trattamento con 5-FU e FOLFIRI utilizzati su cellule tumorali coltivate in *scaffold* CRLM in confronto a matrici HL. Gli *scaffold* CRLM e HL ripopolati e le cellule HT-29 cresciute in 2D, sono stati trattati per tre giorni consecutivi con la dose IC50 di 5-FU o FOLFIRI determinata sperimentalmente in condizioni 2D (Figura 5A, C) (rispettivamente, 1.3 e 1.01 μM , Figura S7 [6]).

Non è stato rilevato alcun cambiamento nella vitalità delle cellule HT-29 quando coltivate in 3D in presenza di 5-FU, e gli *scaffold* CRLM e HL ricellularizzati e trattati mostravano tendenze di proliferazione simili rispetto ai corrispondenti non trattati (Figura 5A). Il rapporto tra cellule Caspasi-3⁺/Ki-67⁺ è risultato simile tra i diversi *scaffold* ricellularizzati, con una quantità molto bassa di cellule Caspasi-3⁺ (Figura 5B, D). Il complesso ambiente 3D fornito dagli *scaffold* HL e CRLM sembrava ridurre la sensibilità cellulare ai farmaci (sia 5-FU che FOLFIRI). Infatti, le cellule CRC hanno mostrato un turnover cellulare comparabile (rapporto cellule Caspasi-3⁺/Ki-67⁺) tra *scaffold* trattati e non trattati. È interessante notare che, aumentando la citotossicità del farmaco utilizzando FOLFIRI, si è osservato che la risposta della linea cellulare CRC alla chemioterapia era dipendente dallo *scaffold*. Le cellule HT-29 coltivate in *scaffold* HL hanno mostrato una significativa riduzione della proliferazione cellulare rispetto agli *scaffold* non trattati ($p = 0,002$ al giorno 7 e $p = 0,023$ al giorno 8) (Figura 5C). Al contrario, gli *scaffold* ripopolati con CRLM hanno mostrato un tasso di proliferazione inalterato rispetto ai campioni non trattati (Figura 5C). Parallelamente, le cellule HT-29 trattate con 5-FU o FOLFIRI hanno mostrato un tasso di proliferazione significativamente ridotto rispetto alle colture non trattate (5-FU, $p = 0,004$ al giorno 7 e $p = 0,0033$ al giorno 8; FOLFIRI, $p = 0,005$ al giorno 6, $p < 0,0001$ al giorno 7 e $p < 0,0001$ al giorno 8) (Figura 5A, C).

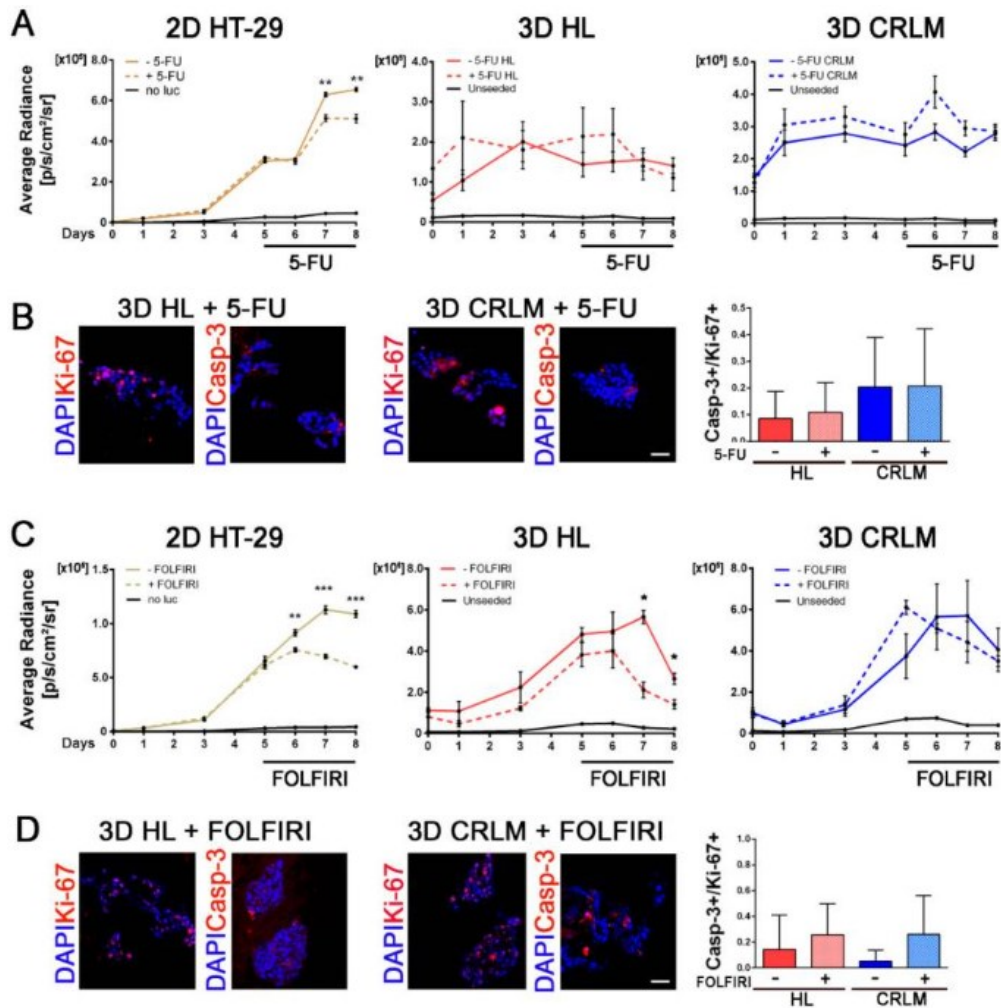


Figura 5. Trattamento chemioterapico di *scaffold* HL e CRLM ricellularizzati e cellule HT-29 coltivate in 2D. **(A)** Vitalità cellulare misurata in risposta al trattamento con 5-FU. Le cellule HT-29 sono state coltivate in 2D (marrone, linea tratteggiata per + 5-FU e linea continua per - 5-FU; n = 3 repliche) o in *scaffold* HL (n = 6) e CRLM (n = 6) (rispettivamente, rosso e blu, linea tratteggiata per + 5-FU e linea continua per - 5-FU) per 5 gg, e quindi esposte a 5-FU (1 μ M) per 3 gg. Le colture senza l'aggiunta di 5-FU o D-luciferina (nero) o *scaffold* non seminati (nero) sono stati usati come controlli. **(B)** Immagini immunofluorescenti rappresentative e quantificazione del segnale delle cellule Ki-67⁺ (rosso) e Caspasi-3⁺ (rosso) in *scaffold* ripopolati con cellule HT-29 e trattati con 5-FU per 8 gg; i nuclei sono stati controcolorati con DAPI (blu). **(C)** Vitalità cellulare misurata in risposta al trattamento con FOLFIRI. Le cellule HT-29 sono state coltivate in *scaffold* 3D (marrone, linea tratteggiata per + FOLFIRI e linea continua per - FOLFIRI; n = 3 repliche) o in *scaffold* HL (n = 9) e CRLM (n = 9) (rispettivamente, rosso e blu, linea continua per + FOLFIRI e linea tratteggiata per - FOLFIRI) per 5 gg e poi esposte a FOLFIRI (1 μ M) per 3 gg. Le colture senza l'aggiunta di FOLFIRI o D-luciferina (nero), o gli *scaffold* non seminati (nero), sono stati usati come controlli. **(D)** Immagini immunofluorescenti rappresentative e quantificazione del segnale delle cellule Ki-67⁺ (rosso) e Caspasi-3⁺ (rosso) in *scaffold* ripopolati con cellule HT-29 trattati con FOLFIRI per 8 gg; i nuclei sono stati controcolorati con DAPI (blu). *Scale Bar*: 50 μ m. Per il grafico a linee, * *p*-value < 0,05; ** *p*-value < 0,01; e *** *p*-value < 0,001 mediante test *t* di Student.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il cancro coloretale è il terzo tumore più comune al mondo, e le metastasi al fegato sono la causa principale di morte nella maggior parte dei pazienti. La disseminazione delle cellule maligne dai tumori primari ai siti metastatici è un passaggio fondamentale nella progressione del cancro. Due concetti importanti nell'ambito della formazione di metastasi sono che, (i) i microambienti organo-specifici influenzano il destino delle cellule tumorali disseminate, secondo la teoria del seme e del terreno, e (ii) le interazioni tra cellule tumorali ed ECM hanno ruoli importanti in tutte le fasi della cascata metastatica. Un tumore è costituito sia dalle cellule maligne che dal compartimento stromale, ed entrambi svolgono un ruolo importante nella progressione della malattia del CRC e nelle metastasi. Lo stroma tumorale è costituito dalle cellule non maligne del tumore e da parti acellulari, che sono rappresentate dall'ECM. Questo compartimento, nell'insieme, svolge un ruolo importante nella progressione del tumore e nelle metastasi. L'ECM in particolare ha la funzione di conferire al tessuto peculiari caratteristiche fisiche e biochimiche ed è strettamente regolata in un tessuto sano; una cellula maligna può interrompere questo controllo strettamente regolato, causando il rimodellamento disorganizzato dell'ECM, che porta alla generazione di un microambiente canceroso che guida la progressione del tumore [9]. Fino ad ora, la maggior parte della ricerca sul cancro è stata condotta tramite colture cellulari 2D *in vitro*, tuttavia è noto che le cellule si comportano in modo diverso nelle colture 2D e 3D. In questo lavoro è stato descritto un nuovo modello di studio delle metastasi epatiche da CRC, usando *scaffold* da ECM organo-specifica per sviluppare veri e propri costrutti 3D derivati direttamente da campioni di tessuto di pazienti, utilizzando la tecnica della decellularizzazione. Questo metodo si propone l'eliminazione della componente cellulare del tessuto patologico derivato dal paziente, mantenendo però le proprietà fenotipiche e biologiche del microambiente metastatico *in vivo*, superando così le limitazioni dei modelli 2D. A tale scopo, è stata innanzitutto verificata l'efficienza del protocollo di decellularizzazione usato, il quale si è dimostrato efficace nel rimuovere la componente cellulare e il materiale genetico del tessuto di partenza, preservando al contempo l'ECM. In particolare, le colorazioni DAPI e H&E e la quantificazione del DNA dopo ogni ciclo DET hanno confermato il successo della deplezione cellulare e del materiale genetico, mentre il mantenimento dell'ultrastruttura è stato confermato attraverso l'analisi SEM, l'analisi immunoistochimica (immunolocalizzazione del collagene IV) e valutazioni istologiche (colorazioni Tricromica di Masson, di Van Gieson, Alcian Blue, con argento e PAS). Un aspetto importante, oltre al mantenimento dei componenti chiave dell'ECM in entrambi i tessuti HL e CRLM post-DET, è che gli *scaffold* CRLM decellularizzati hanno

mantenuto le caratteristiche istopatologiche del CRLM pre-DET rispetto all'HL, come la sovra-espressione di mucine acide e neutre, le quali mascherano il rilevamento di antigeni associati al tumore, impedendone il riconoscimento da parte degli effettori immunitari antitumorali e contribuiscono, quindi, al fenotipo maligno.

In secondo luogo, è stato verificato il potenziale degli *scaffold* decellularizzati di supportare vitalità cellulare in modo tessuto-specifico e la migrazione, attraverso la semina di cellule HT-29 Luc-ZsGreen⁺ in *scaffold* CRLM e CRC, utilizzando i rispettivi campioni sani come controlli. Per quanto riguarda la vitalità cellulare, le cellule HT-29 hanno dimostrato la capacità di aderire e proliferare in tutti e quattro i tipi di *scaffold*, seppur con attività metaboliche significativamente diverse tra i vari campioni di tessuto. In particolare, si è osservata una vitalità cellulare significativamente più elevata negli *scaffold* CRC al quarto giorno di coltura rispetto a quelli HC, che risulta coerente con quella che è la caratteristica fondamentale delle cellule tumorali, ovvero il tasso proliferativo alterato. Questo dato è stato confermato dalla rilevazione di un numero relativo più elevato di cellule Ki-67⁺ negli *scaffold* CRC rispetto a tutti gli altri campioni. Un'altra osservazione importante riguardo gli *scaffold* CRC, ma anche i rispettivi campioni sani, è che il tasso di proliferazione al giorno 10 di coltura appariva inferiore rispetto a quello della coltura convenzionale in 2D, risultando più simile a quello delle cellule trapiantate *in vivo* come xenotrapianti (attuale *gold standard* preclinico per la valutazione dell'efficacia dei farmaci); ciò suggerisce che l'ambiente 3D potrebbe ricapitolare la crescita delle cellule in modo più realistico rispetto al modello di coltura 2D. Le cellule seminate in *scaffold* HL e CRLM invece, hanno dimostrato una differenza iniziale nel tasso di vitalità, significativamente maggiore negli *scaffold* CRLM al giorno 3, e successivamente è stata esibita una tendenza simile tra i due *scaffold* fino a 10 gg di coltura. Questi dati sono coerenti con l'osservazione clinica, secondo la quale le metastasi epatiche di CRC sono meno proliferative rispetto ai CRC primari [10]. Anche negli *scaffold* HL e CRLM si è osservata una proliferazione ridotta al giorno 10 di coltura, rispetto alle condizioni 2D. Ulteriori analisi hanno dimostrato che la differenza nei tassi di proliferazione tra cellule coltivate in *scaffold* CRC e CRLM non era dovuta ad un aumento di apoptosi negli *scaffold* CRLM.

Per quanto riguarda la migrazione cellulare, si è osservato che le cellule HT-29 iniettate nel lato sinistro degli *scaffold* e coltivate per 4 gg, migravano verso l'estremità destra del campione, con un potenziale di migrazione diverso tra *scaffold* sani e tumorali. In particolare, gli *scaffold* sani HL e HC hanno mostrato una capacità di migrazione simile, inferiore rispetto agli *scaffold* derivati da tumore. Poiché un buon equilibrio tra linearizzazione delle fibre di collagene e abbondanza di collagene reticolare è fondamentale per l'extravasazione e la

migrazione delle cellule metastatiche, è stato analizzato lo stroma degli *scaffold* CRLM. In particolare, tramite la colorazione H&E e l'*imaging* SHG, è stato rilevato un basso contenuto di collagene lineare (collagene IV), ma un'elevata densità di fibre reticolari e altri componenti proteici associati all'ECM, che potrebbe spiegare parzialmente la maggiore capacità di migrazione delle cellule HT-29 osservata negli *scaffold* CRLM rispetto agli *scaffold* di tessuto sano. L'aumento della capacità di invasione e migrazione cellulare è stato associato al processo di progressione del tumore e identificato da cambiamenti molecolari, fenotipici e comportamentali che, nel loro insieme, prendono il nome di transizione epitelio-mesenchimale (EMT). L'EMT nel CRC è caratterizzata dalla *down*-regolazione dell'E-caderina, dall'*up*-regolazione di Vimentina, e dalla regolazione positiva dei geni *SNAI-1* e *ZEB-1*. Analizzando il profilo EMT di cellule tumorali (HT-29 e HCT-116) nei diversi *scaffold* si è osservato che l'espressione dei marcatori EMT è risultata coerente con l'effettiva EMT *in vivo* solo negli *scaffold* CRLM seminati con cellule HT-29. Al contrario, in condizioni 3D senza la presenza di ECM (inchiostro biostampabile in 3D), in condizioni 2D, e negli *scaffold* 3D coltivati con cellule HCT-116, questa coerenza non è stata riscontrata. Questi dati sottolineano ancora una volta che i sistemi convenzionali di coltura 2D non sono in grado di imitare l'organizzazione cellula-tessuto 3D *in vivo* e sono privi di segnali biochimici e interazioni cellula-cellula e cellula-ECM. I diversi risultati osservati per i geni correlati a EMT e l'espressione proteica tra le due linee cellulari di CRC invece, potrebbero essere dovuti al fatto che HCT-116 è una linea altamente aggressiva con poca o nessuna capacità di differenziamento, mentre HT-29 ha una capacità intermedia di differenziarsi in enterociti e linee che esprimono mucina. Sulla base di ciò, si può ipotizzare che le cellule possano rispondere in modo diverso agli stimoli degli *scaffold* 3D derivati da paziente, in base al loro stato di differenziamento. Questi dati hanno confermato che i cambiamenti nel comportamento e nel fenotipo delle cellule non sono dovuti solo ad un passaggio da condizioni di coltura 2D a 3D, ma sono il risultato dell'utilizzo di *scaffold* organotipici specifici derivati da paziente.

Come ultimo aspetto, è stata analizzata la risposta terapeutica a trattamento chemioterapico degli *scaffold* 3D, e confrontata con quella delle colture 2D. I risultati dimostrano che la risposta delle cellule CRC coltivate in 3D alla somministrazione di 5-FU e FOLFIRI è stata influenzata dal complesso microambiente fornito dagli *scaffold* decellularizzati tessuto-specifici. Le cellule HT-29 coltivate in *scaffold* CRLM si sono dimostrate più resistenti al trattamento con 5-FU e FOLFIRI ad una concentrazione IC50 convenzionale (determinata nelle colture in 2D). Ciò indica che il sistema di coltura 3D imita meglio il microambiente tumorale rispetto alle colture 2D, poiché le cellule tumorali *in vivo* sono

solitamente non reattive agli agenti chemioterapici utilizzati ad una concentrazione efficace nelle colture 2D.

Per concludere, i principali limiti di questo studio si riscontrano nel grado di variabilità tra costrutti derivati dallo stesso tipo di tessuto, e nella mancanza di una componente cellulare stromale nei sistemi di coltura usati, specialmente quando si mira allo studio delle interazioni tra cellule tumorali e stroma. Per risolvere quest'ultimo problema, sarebbe necessario aggiungere cellule stromali epatiche e un sistema di perfusione dinamico. Ciò nonostante, il modello di coltura 3D usato si è dimostrato efficiente nel ricapitolare le dinamiche biochimiche e strutturali di CRLM, fornendo un modello ingegnerizzato di CRLM, che potrebbe rappresentare un importante strumento per indagare le interazioni rilevanti tra cellule e microambiente nel cancro metastatico in un modo più specifico per i tessuti rispetto ai sistemi di coltura 2D convenzionali.

In conclusione, la presente ricerca ha permesso di stabilire un modello di coltura tissutale 3D fisiologicamente rilevante, che è in grado di imitare le caratteristiche che il tessuto CRLM esibisce *in vivo*, quali la proliferazione, la migrazione e la risposta ai farmaci chemioterapici delle cellule CRC nel tessuto metastatico del fegato e, in quanto tale, rappresenta un promettente strumento per indagare la biologia del CRLM *in vitro*.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin DM, Forman D., Bray F. Incidenza e mortalità per cancro nel mondo: fonti, metodi e modelli principali in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 2015; 136: E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] Duan B, Zhao Y, Bai J, Wang J, Duan X, Luo X, Zhang R, Pu Y, Kou M, Lei J, Yang S. Colorectal Cancer: An Overview. In: Morgado-Diaz JA, editor. *Gastrointestinal Cancers* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022. Chapter 1. PMID: 36343150.
- [3] Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJ, Watanabe T. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1: 15065. doi: 10.1038/nrdp.2015.65.
- [4] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): 453-8. doi: 10.1038/nrc1098.
- [5] Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, Werner J, Angele M. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*. 2019; 2019: 7407190. doi: 10.1155/2019/7407190.
- [6] D'Angelo E, Natarajan D, Sensi F, Ajayi O, Fassan M, Mammano E, Pilati P, Pavan P, Bresolin S, Preziosi M, Miquel R, Zen Y, Chokshi S, Menon K, Heaton N, Spolverato G, Piccoli M, Williams R, Urbani L, Agostini M. Patient-Derived Scaffolds of Colorectal Cancer Metastases as an Organotypic 3D Model of the Liver Metastatic Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(2): 364. doi: 10.3390/cancers12020364.
- [7] Piccoli M., D'Angelo E., Crotti S., Sensi F., Urbani L., Maghin E., Burns A., De Coppi P., Fassan M., Ruge M., et al. Matrice decellularizzata del cancro coloretale come microambiente bioattivo per la ricerca sul cancro in vitro 3D. *J. Cell. Physiol*. 2018; 233 :5937–5948. doi: 10.1002/jcp.26403.
- [8] Nebuloni M, Albarello L, Andolfo A, Magagnotti C, Genovese L, Locatelli I, Tonon G, Longhi E, Zerbi P, Allevi R, Podestà A, Puricelli L, Milani P, Soldarini A, Salonia A, Alfano M. Insight On Colorectal Carcinoma Infiltration by Studying Perilesional Extracellular Matrix. *Sci Rep*. 2016; 6: 22522. doi: 10.1038/srep22522.
- [9] Karlsson S, Nyström H. The extracellular matrix in colorectal cancer and its metastatic settling – Alterations and biological implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2022; Volume 175, 103712, ISSN 1040-8428.
- [10] Anjomshoa A, Nasri S, Humar B, McCall JL, Chatterjee A, Yoon HS, McNoe L, Black MA, Reeve AE. Slow proliferation as a biological feature of colorectal cancer metastasis. *Br J Cancer*. 2009; 101(5): 822-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6605229.