

POLITECNICO DI TORINO

Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

Modello tridimensionale di glioblastoma multiforme per test in vitro di nanomedicine

Relatore

Prof. Gianluca CIARDELLI

Co-Relatore

Prof. Clara MATTU

Candidato

Carlotta MATTIODA

Luglio 2021

Indice

Elenco delle tabelle	IV
Elenco delle figure	V
Introduzione	1
Il Glioblastoma Multiforme	1
Standard terapeutico	2
Stato dell'arte: Modelli tridimensionali del Glioblastoma Multiforme . . .	8
Sferoidi e Organoidi derivanti dal tumore primario	9
Modelli tumorali ottenuti da organoidi cerebrali geneticamente ingegnerizzati	13
Co-cultura di cellule di GBM e organoidi cerebrali	16
Modelli di GBM realizzati con stampa 3D	20
Obiettivo del lavoro	24
1 Materiali e Metodi	25
1.1 Materiali	25
1.1.1 Linee Cellulari	25
1.2 Metodi	26
1.2.1 Colture cellulari	26
1.2.2 Realizzazione del modello	28
1.2.3 Preparazione delle nanoparticelle	32
1.2.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle	33
2 Risultati e Discussione	35
2.1 Colture cellulari	35
2.1.1 Analisi della risposta al BTZ in colture bidimensionali . . .	35
2.1.2 Analisi della risposta al BTZ in colture tridimensionali . . .	39
2.2 Realizzazione del modello	47
2.2.1 Cellularizzazione dei canali di perfusione	47
2.2.2 Test di permeabilità vascolare	53

2.2.3	Introduzione dello sferoide tumorale	56
3	Conclusioni	60
	Bibliografia	62

Elenco delle tabelle

1.1	Componenti del cocktail di fattori di crescita somministrati	31
2.1	Risultati ottenuti dalle analisi col DLS	54

Elenco delle figure

1	Image Credit: Bristol-Myers Squibb Company	3
2	Numero di casi e incidenza del GBM nel corso degli anni [3]	5
3	Rappresentazione schematica della progettazione di un sistema di nanoteranostica [4]	6
4	Nella tabella si osserva lo sviluppo di diverse metodologie di coltura di cellule staminali neurali e di cellule di GBM in forma di monolayer, sferoidi o organoidi [7]	10
5	In figura sono schematicamente rappresentati lo sviluppo, la caratterizzazione e le applicazioni del GBO di Jacob et al. [11]	12
6	a. Rappresentazione schematica della coltivazione degli organoidi e del processo di nucleofezione. b.Vengono mostrate le immagini ottenute dopo aver effettuato lo staining delle sostanze indicate nelle singole figure [13]	14
7	Protocollo di Ogawa et al. per lo sviluppo di organoidi cerebrali geneticamente modificati [14]	15
8	Rappresentazione schematica del protocollo di Linkous et al. per lo sviluppo di GLICO [15]	17
9	a. In figura viene rappresentato il chip all'interno del quale sono stati inseriti i colorati ai diversi time-point, si può notare che i coloranti non sono in grado di diffondere attraverso la matrice dell'idrogelo. b. Rappresentazione schematica del design del chip. [16]	19
10	Applicazione del GBM-on-a-chip di Yi et al	20

11	a. Rappresentazione schematica di una sezione trasversale di GBM. b. Illustrazione del processo di stampaggio del GBM-on-a-chip di Yi et al. c.Immagine del GBM-on-a-chip d.Mappa colorimetrica della concentrazione dell'ossigeno lungo la sezione trasversale del chip e. Rappresentazione schematica del core (i) e delle regioni intermedia (ii) e periferica (iii) del GBM stampato e dei tessuti circostanti (iv) f. Immagini dello staining immunologico nelle diverse regioni del chip g. Immagini rappresentative del GBM-on-a-chip ottenute con il microscopio ottico a contrasto di fase (sinistra) e con il microscopio a fluorescenza (destra).	22
1.1	Rappresentazione schematica del protocollo utilizzato per la realizzazione degli sferoidi. I vari mix di popolazioni cellulari sono stati piastrati, nei rapporti desiderati, all'interno di una multi-well da 96 pozzetti con fondo ad U anti-adesiva e mantenuti in incubatore per 4 giorni. Immagine realizzata con BioRender.com	27
1.2	Rappresentazione schematica del protocollo per la misurazione della vitalità cellulare. Le cellule sono state piastrate in una multi-well da 96 e trattate con il farmaco. Allo scadere dei time-points, dopo i lavaggi con PBS, è stato somministrato il reagente (CellTiter Glo®). Il segnale è stato analizzato con il lettore di piastre. Immagine realizzata con BioRender.com	28
1.3	Schema chip OrganoPlate® Graft, MIMETAS	29
1.4	Per la preparazione delle NPs i lipidi vengono solubilizzati in acqua distillata e la soluzione ottenuta è portata a 60°C sotto agitazione. In questa condizione viene aggiunta la soluzione contenente il BTZ e il polimero in acetonitrile goccia a goccia. Il composto ottenuto viene trasferito in un filtro e centrifugato per 15 minuti a 3200 rpm. Immagine realizzata con BioRender.com	33
2.1	Nei grafici sono mostrati i risultati del saggio di vitalità effettuati sulle colture singole di cellule della microglia (A) e cellule tumorali differenziate (B) e sulle co-culture bidimensionali di U87-MG e HMC-3 in rapporto 70:30 (C) e 50:50 (D)	36
2.2	Nei grafici sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità sulle colture bidimensionali trattate con diverse concentrazioni di BTZ (10nM, 20nM e 50nM rispettivamente A,B e C)	37
2.3	Le immagini rappresentano le co-cultura di cellule della microglia e cellule tumorali differenziate GFP+ nei due rapporti analizzati (50/50 e 70/30) trattate con diverse concentrazioni di BTZ a 24h (A), 48h (B) e 72h (C) dal trattamento. Scale bar 100 µm	38

2.4	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla coltura singola di cellule della microglia e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μm	39
2.5	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla coltura singola di cellule tumorali differenziate e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μm	40
2.6	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia (50:50) e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μm	41
2.7	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia (70:30) e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μm	41
2.8	Nei grafici sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità sulle colture tridimensionali trattate con diverse concentrazioni di BTZ (10nM, 20nM e 50nM rispettivamente A,B e C)	42
2.9	In figura sono riportati i risultati dei test di vitalità effettuati sugli sferoidi costituiti da cellule staminali tumorali (A), cellule tumorali differenziate e cellule staminali tumorali (90:10 (B)) e cellule staminali tumorali, cellule tumorali differenziate e cellule della microglia in rapporto 50:50 (C) e 70:30 (B)	43
2.10	Nei grafici sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità sulle co-culture tridimensionali in presenza di cellule staminali tumorali, trattate con diverse concentrazioni di BTZ (10nM, 20nM e 50nM rispettivamente A,B e C)	44
2.11	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule staminali tumorali (90:10). Scale bar 100 μm	45
2.12	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate, cellule staminali tumorali e cellule della microglia (50:50). Scale bar 100 μm	45
2.13	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate, cellule staminali tumorali e cellule della microglia (70:30). Scale bar 100 μm	46
2.14	In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate, cellule staminali tumorali GFP+ (A) e dal mix i cellule staminali tumorali e cellule differenziate in co-coltura con cellule della microglia nei rapporti 50:50 (B) e 70:30 (C). Scale bar 100 μm	46

2.15	In figura è rappresentato il comportamento delle cellule endoteliali cerebrali inserite nei microcanali del chip in assenza (A) e in presenza (B) del gel di collagene all'interno della graft chamber. Le immagini sono state acquisite 24 ore dopo la semina. Scale bar 100 μm . . .	48
2.16	La figura mostra alcuni dei principali difetti riscontrati nei canali di perfusione rivestiti con cellule endoteliali. A) Presenza di macro-aggregati fluttuanti dovuti alla scarsa adesione delle cellule nel canale; B) Distacco del rivestimento endoteliale del canale (giorno 7). Scale bar 100 μm	49
2.17	A) Immagine del canale di perfusione 3 giorni dopo la semina delle cellule endoteliali cerebrali. Scale bar 100 μm B) Immagine del canale di perfusione 5 giorni dopo la semina delle cellule endoteliali cerebrali. Scale bar 100 μm C) Ingrandimento della parete del canale di perfusione. Scale bar 20 μm	50
2.18	A) Ingrandimento del canale di perfusione in cui le cellule endoteliali sono state marcate con l'anticorpo Anti-CD31 (in rosso) e con il DAPI (in blu). Scale bar 20 μm . B) Ingrandimento del canale di perfusione in cui le cellule endoteliali sono state marcate con l'anticorpo Anti-ZO1 (in rosso) e con il DAPI (in blu) Scale bar 20 μm	51
2.19	Sviluppo della rete capillare in seguito alla somministrazione dei fattori di crescita. In figura sono rappresentati i capillari prima della somministrazione dei fattori di crescita (A), al giorno 1 (B) e al giorno 5 (C). Scale bar 100 μm	51
2.20	A) Sviluppo dei vasi in seguito alla somministrazione dei fattori di crescita. Scale bar 100 μm B) Ingrandimento del canale di perfusione su cui è stato effettuato il rivestimento con la gelatina. Scale bar 50 μm	52
2.21	A) Ingrandimento della rete capillare su cui è stato effettuato lo staining con l'anticorpo Anti-CD31 (in rosso) e con il DAPI (in blu). Scale bar 20 μm B) Ingrandimento della rete capillare su cui è stato effettuato lo staining con l'anticorpo Anti-ZO1 (in rosso) e con il DAPI (in blu). Scale bar 20 μm	53
2.22	Nel grafico è rappresentato l'andamento del rilascio cumulativo nei 7 giorni successivi alla preparazione della NPs	54
2.23	A) Canale di perfusione a 7 giorni dalla somministrazione dei fattori di crescita. Scale bar 100 μm B) immagine in fluorescenza del canale di perfusione al cui interno sono state introdotte nanoparticelle funzionalizzate con la rodamina. Scale bar 100 μm	55
2.24	Nell'immagine è rappresentato il chip all'interno del quale è stato inserito lo sferoide tumorale 1 ora dopo il posizionamento. Scale bar 100 μm	56

2.25	Nell'immagine è rappresentato il chip all'interno del quale è stato inserito lo sferoide tumorale 24 ore dopo il posizionamento. Scale bar 100 μm	57
2.26	In figura sono mostrati gli sferoidi tumorali coltivati all'interno del VitroGel® 3D a diversi time-point. Scale bar 100 μm	58
2.27	In figura viene rappresentato il chip all'interno del quale è stato introdotto il VitroGel® 3D. A 1 ora dal posizionamento lo sferoide mantiene la struttura tridimensionale. Scale bar 100 μm	59
2.28	In figura viene rappresentato il chip all'interno del quale è stato introdotto il VitroGel® 3D. A 1 ora dal posizionamento lo sferoide mantiene la struttura tridimensionale. Scale bar 100 μm	59

Sommario

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most malignant primary brain tumor in adults. medical treatment is a combination of resection (when feasible) followed by radiotherapy and chemotherapy, which results in a dismal survival of 14.6 months. Additionally, this treatment regimen is aggressive and poorly selective, resulting in intracranial metastases and systemic side effects. The main features of GBM involve nuclear atypia, highly infiltrative and invasive phenotype and necrosis. Moreover, the heterogeneous composition, characterized by the presence of distinct cell types with different morphologies, genetic mutation and differentiation stage, poses a remarkable challenge in the identification of the proper treatment strategy. Indeed, the presence of a Cancer Stem Cells (CSCs) niche, combined with the heterogeneity of the tumor microenvironment, composed of immune cells, endothelial cells and other infiltrating cells, facilitates invasion, proliferation and angiogenesis. Thus, the tumor microenvironment plays a fundamental role in determining the tumor response to treatment. The complex GBM landscape requires new and more advanced therapies able to concomitantly address the multiple players involved. The lack of appropriate GBM models, able to fully recapitulate the complexity of this tumor, poses a significant limitation to the advancement of the research in this field. Current 2D and 3D in vitro models fail to replicate the GBM microenvironment, while in vivo models often lack proper immune response, besides being costly and ethically debated. The aim of this work is to design a more reliable in vitro model of GBM comprising CSCs, differentiated GBM cells, resident immune cells, as well as a vascular network. To achieve this, we will use a microfluidic device (OrganoPlate® Graft, MIMETAS) designed to feature i) a vascular channel that can be fully covered by endothelial cells; ii) a graft chamber that hosts the tumor model which can contain multiple cell types; and iii) an intermediate 3D structure that acts as a mimic of the tumor microenvironment, hosting additional cell types as well as a network of micro-vessels. By introducing the appropriate angiogenic signals, such vessels can be induced to vascularize the tumor model, allowing perfusion and drug delivery/release experiments. Here, a 3D tumor spheroid model composed of primary human GBM cells (U87), GBM-associated stem cells (GBM8) and human microglia (HMC-3) in different ratios has been developed. Tumor response to the

chemotherapeutic agent Bortezomib (BTZ) has been assessed both in 2D and in 3D spheroids at different timepoints and at varying drug concentrations. In parallel, vascularization of the microfluidic channel has been optimized, by testing different conditions (such as cell concentration, channel coating, and adhesion time) using human cerebral microvascular endothelial cells (HBEC-5i). The insertion of the GBM model into the device has also been optimized in terms of selection of the gel coating support and maintenance of the spheroid integrity. Since BTZ has been shown to possess strong antitumoral activity in GBM models both, *in vitro* and *in vivo*, but is not able to cross the blood brain barrier, polymer nanoparticles (NPs) for BTZ delivery have been developed and characterized. Such particles can be exploited to enhance brain-accumulation of the drug while minimizing its adverse effects. The final device will contain the vascularized tumor model and will be used to evaluate drug efficacy, comparing the achieved results with the previous *in vivo* data with BTZ. NPs-mediated delivery experiments are in progress to determine the ability of NPs to extravasate through the vessel model. If successful, the developed 3D vascularized GBM model can be further implemented by adding additional components, such as astrocytes and neurons and to test drug delivery strategies to brain tumors.

Introduzione

Il Glioblastoma Multiforme

Il glioblastoma multiforme (GBM) è un tumore primario di IV grado appartenente alla famiglia degli astrocitari ed è una delle più diffuse patologie oncologiche del sistema nervoso centrale (16% delle neoplasie dell'SNC).

Si tratta di un tumore della sostanza bianca degli emisferi cerebrali, dei gangli della base e del talamo che generalmente, nel momento della diagnosi, ha già raggiunto dimensioni considerevoli e invade l'emisfero opposto attraverso il corpo calloso.

Il GBM presenta un rate di proliferazione elevato, le cellule non mostrano sempre un fenotipo astrocitario definito, possono essere isomorfe con citoplasma scarso o polimorfe ed eventualmente presentare nuclei giganti. È un tumore caratterizzato da elevato indice mitotico e necrosi considerevoli che si possono trovare sia in forma di grandi aree necrotiche o di piccole necrosi, queste zone sono dovute a un'elevata attività proliferativa circoscritta che porta a ipossia focale e quindi alla morte cellulare. Altro aspetto caratterizzante del GBM è la presenza di una fitta rete microvascolare, legata alla proliferazione delle cellule endoteliali che deforma la struttura dell'albero vasale del tessuto in cui si sviluppa la neoplasia formando strutture simili a dei glomeruli. Nonostante la vascolarizzazione sia molto importante risulta funzionalmente inefficiente in quanto sono frequenti alterazioni degenerative delle pareti vasali e delle trombosi vasali.

Inoltre sono comuni aree di proliferazione astrocitaria a bassa malignità istologica, principalmente nelle regioni periferiche mentre talvolta è possibile osservare aree di aspetto oligodendrogliale grazie alle quali è possibile supporre l'origine del GBM da un precedente oligodendroglioma.

La presenza di astrociti neoplastici differenziati suggerisce che il GBM possa derivare dalla progressione di un astrocitoma diffuso e dunque si tratterebbe di un glioblastoma secondario che si differenzia dal glioblastoma primario che invece manca di una fase da astrocitoma preliminare. Le due tipologie di GBM si differenziano per l'età d'esordio che è minore nel caso di glioblastomi secondari.

Sono state osservate due serie diverse di percorsi genici che possono portare allo sviluppo del fenotipo del glioblastoma: nel caso dei glioblastomi secondari è molto frequente la presenza della mutazione del gene TP53 (>65%) e la progressione risulta dovuta all'espansione di cloni con p53 modificata e dunque più suscettibili ad alterazioni geniche oncogene. Per quanto riguarda i glioblastomi primari le mutazioni geniche più diffuse sono l'amplificazione e/o la sovra-espressione del gene EGFR¹ implicato nel controllo della proliferazione cellulare.[1]

Come si può notare nella figura 1 il GBM insorge più frequentemente in età matura (45-70 anni) e la frequenza di nuovi casi è leggermente maggiore negli uomini rispetto alle donne e nella razza caucasica rispetto ad altre etnie. In età pediatrica la mediana di sopravvivenza è più lunga rispetto all'adulto, la sopravvivenza a 5 anni infatti è del 2-4% nel caso di pazienti di età superiore ai 21 anni mentre per quelli di età inferiore è del 21%.

Ad oggi ancora non è chiara la causa di questo tipo di neoplasia, alcuni fattori di rischio tuttavia sono:

- Le radiazioni ionizzanti rappresentano un fattore di rischio accertato, soggetti esposti ad esplosioni atomiche, test nucleari o sottoposti a irradiazione del cranio per il trattamento di un tumore durante l'infanzia sono maggiormente a rischio
- La storia familiare: una storia familiare di glioma è associata a un rischio doppio di sviluppare un tumore di questo tipo
- Le malattie genetiche: la presenza di una o più mutazioni genetiche dovute a sindromi ereditarie possono conferire un rischio maggiore per lo sviluppo della neoplasia

Standard terapeutico

Il trattamento del GBM è molto delicato a causa del rischio di danneggiamento dei tessuti sani circostanti, della resistenza ai farmaci e della presenza della barriera ematoencefalica.

Le cause principali della chemoresistenza risiedono nella presenza delle cellule staminali tumorali (CSC's) derivanti dalle cellule staminali embrionali e nella ridotta pressione parziale dell'ossigeno che porta all'innescarsi di un processo di autofagia nella zona intorno al tumore.

Le strategie di terapia attualmente utilizzate prevedono l'intervento chirurgico, la

¹Epidemial Growth Factor Receptor

radioterapia, la chemioterapia e l'immunoterapia.

GLIOBLASTOMA AT-A-GLANCE

GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM), A TYPE OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM CANCER, IS THE MOST COMMON AND MOST AGGRESSIVE FORM OF PRIMARY BRAIN CANCER.

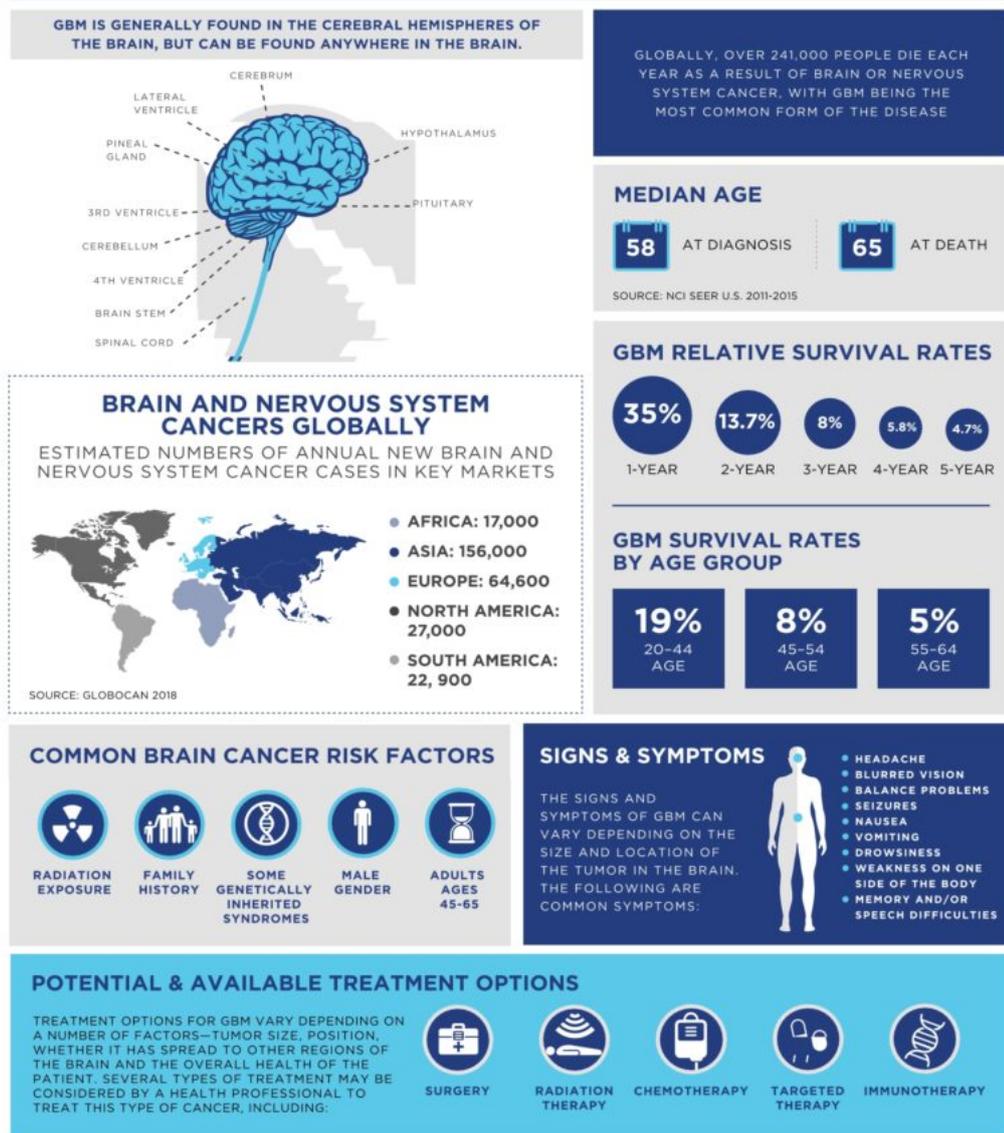


Figura 1: Image Credit: Bristol-Myers Squibb Company

Radioterapia

Generalmente la radioterapia è la prima opzione di trattamento considerata per i pazienti affetti da GBM, nonostante siano presenti, anche in questo caso, delle limitazioni non trascurabili. La risposta del tumore alla radioterapia dipende dalle dimensioni dello stesso: i tumori più grandi risultano essere meno sensibili rispetto a quelli più piccoli. Inoltre il trattamento sembra essere più efficace se effettuata durante i primi cinque anni successivi all'intervento chirurgico.

Questo tipo di terapia presenta effetti collaterali sia acuti, come la formazione ulcere gastrointestinali e il danneggiamento degli epiteli, sia a lungo termine, come la perdita dei capelli, il linfedema e lo sviluppo di disturbi cardiaci.

Chemioterapia

La Temozolomide (TMZ) è il farmaco chemioterapico più utilizzato per il trattamento del GBM. Si tratta di un agente citotossico alchilante stabile a pH acido che viene generalmente impiegato negli stadi iniziali dello sviluppo del GBM eventualmente associato alla radioterapia per massimizzarne l'effetto.

Anche questo tipo di terapia presenta effetti collaterali non trascurabili quali danni neuronali, nausea, vomito, perdita dei capelli, infertilità e insonnia.

Immunoterapia

Esistono diversi tipi di immunoterapia che possono essere impiegati nel trattamento del GBM come l'utilizzo degli inibitori dei checkpoint immunitari, la terapia virale e l'immunoterapia con le cellule dendritiche. Tuttavia rimangono delle difficoltà relative alla selezione del paziente, al monitoraggio dei risultati e alla valutazione dei possibili effetti collaterali.

Nonostante siano stati ottenuti risultati preclinici notevoli risulta complesso il passaggio alle sperimentazioni in ambito clinico a causa delle differenze presenti fra le diverse specie e della difficoltà nella determinazione di una dose massima tollerabile. [2]

Sebbene siano stati effettuati diversi trial clinici lo standard di trattamento del GBM è rimasto invariato negli ultimi anni come anche il tempo di sopravvivenza medio (circa 15 mesi) mentre il numero di casi ha continuato complessivamente ad aumentare come si osserva in figura 2. È ormai assodato che l'elevato livello di eterogeneità fra i tumori e all'interno del tumore stesso è causa dello scarso successo dei trial.

Per aumentare l'efficacia dello standard terapeutico sono stati ottenuti risultati

incoraggianti con l'impiego delle nanoterapie.

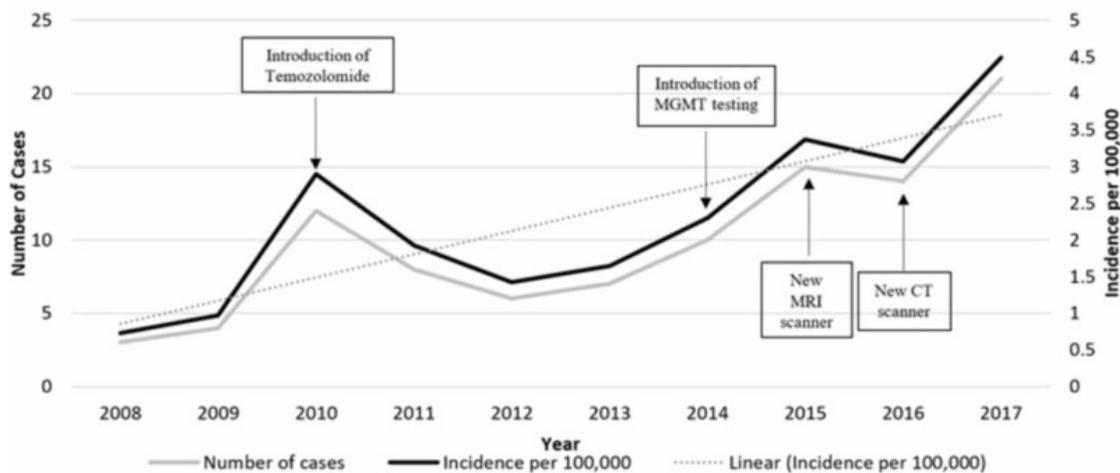


Figura 2: Numero di casi e incidenza del GBM nel corso degli anni [3]

Nanoterapie per il trattamento del Glioblastoma Multiforme

Il trattamento tradizionale del GBM risulta inefficace per diversi motivi come l'incapacità di rimuovere l'intero volume di cellule tumorali durante l'intervento, la difficoltà nel raggiungimento del sito tumorale a causa della presenza della barriera ematoencefalica e i limiti della radioterapia che non è in grado di eradicare le cellule di GBM radio-resistenti, specialmente le staminali tumorali.

I farmaci nano-formulati si presentano con una struttura principale che può essere composta da diversi costituenti, come lipidi, polimeri, dendrimeri o metalli, all'interno della quale sono inseriti agenti anti-tumorali. A questi sistemi possono essere associati dei componenti radioattivi o fluorescenti che permettono di effettuare una migliore localizzazione del sito tumorale. In figura 3 viene mostrato come queste strutture vengono realizzate.

L'impiego delle nanoterapie nel trattamento del GBM sembra portare notevoli vantaggi a partire da un miglioramento nel targeting delle cellule tumorali. Esistono diverse vie di somministrazione delle nanoparticelle che possono essere considerate per il trattamento del GBM. L'iniezione intracranica permette al farmaco di raggiungere direttamente il sito tumorale senza dover superare la barriera ematoencefalica. È stato osservato che questo è in grado di permanere in situ per un lasso di tempo sufficientemente lungo (circa un mese) se all'interno di un sistema

nano-formulato mentre risulta altamente inefficiente nel caso di farmaco libero, in quanto, in questo caso, il farmaco viene facilmente metabolizzato o espulso dal tumore. La somministrazione intranasale è un'altra via di somministrazione che permette di pervenire nel sito patologico superando la barriera ematoencefalica. L'impiego di formulazioni alla nanoscala permette di sfruttare l'effetto EPR², la dimensione della nanoparticelle, confrontabile con quella delle fenestrature presenti sui vasi sanguigni tumorali, consente al farmaco di lasciare il torrente ematico e raggiungere il tumore. È possibile attuare una strategia di targeting attivo andando a funzionalizzare la superficie delle nanoparticelle in modo tale da ottenere un riconoscimento specifico delle cellule tumorali. Un'altra applicazione interessante è il targeting magnetico che sfrutta l'applicazione di campi magnetici esterni per indurre la diffusione del farmaco all'interno del tumore.

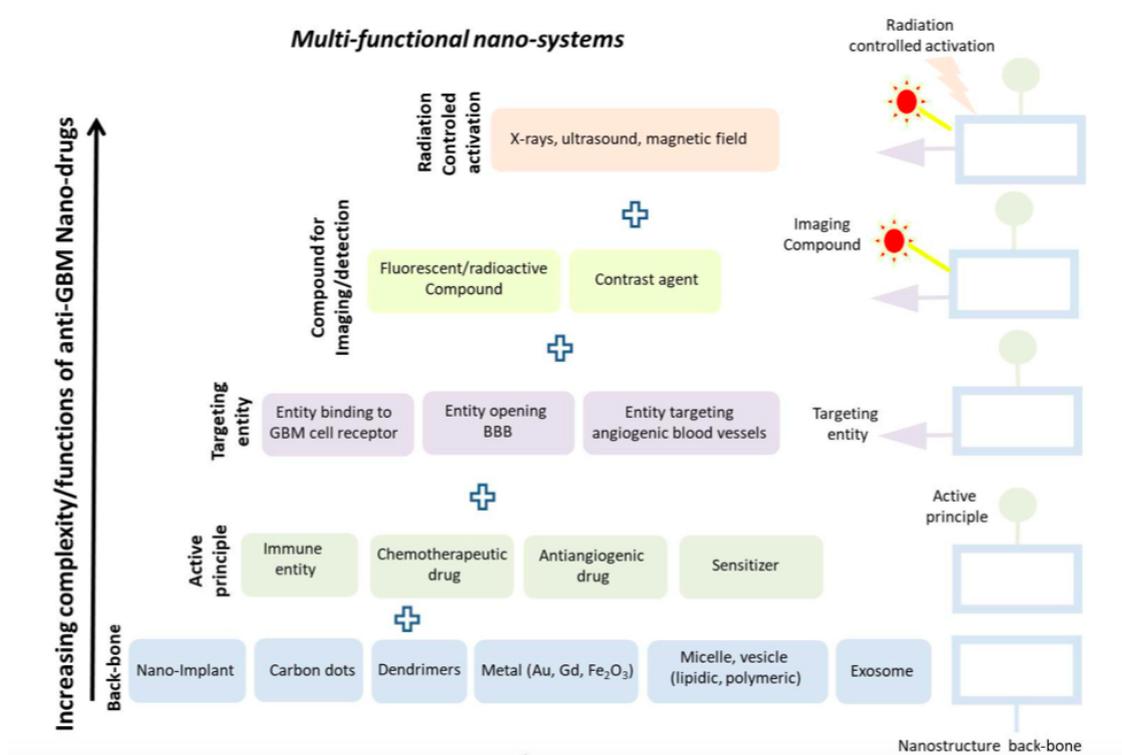


Figura 3: Rappresentazione schematica della progettazione di un sistema di nanoteranostica [4]

L'efficacia del trattamento risulta incrementata grazie all'introduzione delle

²enhanced permeability and retention

nanoterapie in quanto il loro impiego comporta un aumento significativo dell'internalizzazione cellulare del farmaco e della sensibilità alla radioterapia. Inoltre si osserva una maggiore efficacia della risposta immunitaria grazie all'attivazione delle cellule immunitarie anti-tumorali.

Come ampiamente descritto da E. Alphandéry [4] sono stati effettuati diversi studi che dimostrano un incremento dell'attività anti-tumorale dei farmaci chemioterapici quando questi vengono associati a strutture nano-formulate. Questo effetto è anche dovuto alla possibilità di indurre il rilascio del farmaco in seguito all'applicazione di stimoli esterni come una variazione del potenziale REDOX, una variazione di pH o l'applicazione di campi magnetici esterni o ultrasuoni. In questo modo il rilascio risulta maggiormente controllato nello spazio e nel tempo a differenza di quanto si osserva nel caso della somministrazione del farmaco libero. Sono state impiegate nanoparticelle inorganiche anche nel campo dell'ipertermia, magnetica e fototermica, della terapia genica e dell'immunoterapia. Sono presenti diversi studi che descrivono l'applicazione delle nanotecnologie nell'ambito dei trattamenti anti-angiogenici. È stato osservato nello studio proposto da I. Naletova et al. [5] che l'impiego di nano-complessi costituiti da Angiogenina (ANG) e nanoparticelle d'oro ha portato allo sviluppo di un comportamento anti-angiogenico delle cellule tumorali.

Dunque l'utilizzo delle nanotecnologie nel il trattamento del GBM comporta vantaggi significativi come la capacità di diffondere attraverso la barriera ematoencefalica con maggiore efficienza e l'incremento dell'attività anti-tumorale mediante l'attivazione di meccanismi locali quali l'attivazione del sistema immunitario, la generazione di radicali liberi e la possibilità di indurre il rilascio del farmaco in base alle condizioni specifiche del microambiente tumorale. Il raggiungimento di uno standard terapeutico efficace risulta però limitato dalla mancanza di un numero sufficiente di pazienti su cui eseguire indagini statistiche significative, dalla diagnosi che generalmente avviene a uno stadio avanzato della patologia e dalla mancanza di modelli preclinici in grado di mimare in maniera ottimale il GBM umano.

Stato dell'arte: Modelli tridimensionali del Glioblastoma Multiforme

*“All models are wrong, but some are useful”
George E. P. Box*

I metodi tradizionali di coltura in vitro richiedono tempi molto lunghi e l'utilizzo di fattori di crescita che potrebbero interferire con il mantenimento dell'espressione genica del tumore originario. Inoltre è stato osservato che le cellule staminali del glioblastoma (GSC), se coltivate in coltura 2D, non esprimono l'organizzazione spaziale che si nota in vivo e di conseguenza viene meno l'interazione tra l'ECM tumorale e il microambiente circostante, dunque difficilmente questi modelli sono in grado di predire la reale efficacia del trattamento.[6]

Nonostante sembri che l'impianto diretto di cellule tumorali prelevate dal paziente in topi, dia origine a tumori che preservano caratteristiche del tumore umano da cui originano, i modelli in vivo risultano soggetti a un'elevata variabilità, richiedono tempi lunghi e non si prestano facilmente ad analisi di espressione genica/proteica o di risposta ai farmaci, che sono invece facilmente esettuabili in vitro.

Al fine di superare queste limitazioni sono stati sviluppati diversi sistemi tridimensionali capaci di mimare il comportamento del GBM. La simultanea presenza di cellule staminali, progenitrici e differenziate e l'elevata eterogeneità intratumorale, dovuta alla presenza di diverse tipologie di cellule in diversi stadi di differenziamento, rendono particolarmente ostico lo sviluppo di questi modelli. [7]

Lo sviluppo di un modello adeguato per la definizione di terapie efficaci e specifiche per il singolo paziente è di fondamentale importanza. Ad oggi sono presenti diversi sistemi che però presentano alcune limitazioni significative:

- Il modello animale non è in grado di rispecchiare fedelmente le caratteristiche genetiche del tumore umano;
- La coltura in vitro, sia nel caso di coltura 2D che nel caso di sferoidi di cellule tumorali, durante il processo di amplificazione può portare allo sviluppo di mutazioni genetiche che non rispecchiano l'espressione genica osservata in vivo;
- Gli xenotrapianti di cellule prelevate dal paziente comportano un impiego elevato di tempo e di risorse e sono caratterizzati da un'eccessiva variabilità intrinseca.

Dunque risulta necessario un modello di GBM innovativo in grado di superare i limiti dei sistemi precedenti. Al momento gli organoidi tumorali rappresentano in maniera più accurata rispetto alla coltura tradizionale 2D, la composizione

cellulare e il comportamento patofisiologico del GBM replicando più fedelmente il microambiente tumorale. Uno dei maggiori vantaggi dell'utilizzo degli organoidi tumorali è la possibilità di coltivare simultaneamente cellule staminali differenti nelle medesime condizioni. In questo modo non solo viene rispecchiata al meglio l'eterogeneità del tumore originario, ma rende anche possibile la comprensione della neurogenesi tumorale. Sebbene questi sistemi si stiano rivelando estremamente utili rimangono ancora delle limitazioni importanti.

La risposta immunitaria ridotta è molto limitante per quanto riguarda l'utilizzo degli organoidi tumorali come modello per lo studio dell'immunoterapia. La mancanza del sistema micro-vascolare, componente fondamentale del microambiente neoplastico, influisce in maniera non trascurabile sulla crescita delle cellule tumorali e sulla risposta immunitaria [8]. Per il futuro è auspicabile una riduzione della variabilità mantenendo però la complessità e l'eterogeneità caratteristiche del GBM. Inoltre l'introduzione di un microambiente capace di mimare la risposta infiammatoria e immunitaria risulterebbe estremamente rilevante nello studio dell'influenza del sistema immunitario sulla nascita e lo sviluppo della neoplasia.

In figura 4 è mostrata l'evoluzione dei modelli cerebrali fisiologici e patologici dal 1992 ad oggi.

Sferoidi e Organoidi derivanti dal tumore primario

Le cellule staminali gliali (GSC) possono essere isolate dal tumore primario mediante una biopsia o durante l'intervento chirurgico e successivamente espanse in vitro utilizzando fattori di crescita quali EGF (epidemia growth factor) e FGF (Fibroblast Growth Factor): queste formeranno spontaneamente degli aggregati sferici.

Le neurosfere sono il primo modello tridimensionale di GBM in cui è stato osservato il mantenimento dell'organizzazione spaziale, sono però caratterizzate dalla presenza di un core necrotico e possono raggiungere un diametro massimo di 300 μm . Inoltre le cellule all'interno delle neurosfere interrompono le interazioni con i componenti della matrice extracellulare allontanandosi dal comportamento che si osserva in vivo. [9]

Nel 2016 è stato sviluppato da J. Rich [10] un metodo per ottenere organoidi a partire da cellule umane di GBM estratte mediante una biopsia. Le cellule venivano incorporate all'interno di Matrigel e sono stati ottenuti in circa 2 mesi organoidi di 3-4 mm di diametro in grado di riprodurre il gradiente di densità delle cellule staminali tumorali osservabile in vivo. Gli autori riportano un'elevata concentrazione di cellule staminali SOX2-positivo nella zona più esterna dell'organoide che diminuisce andando verso il core e quindi verso la regione ipossica, inoltre le cellule SOX2+ mostrano proprietà differenti a livello molecolare in base alla zona dell'organoide in

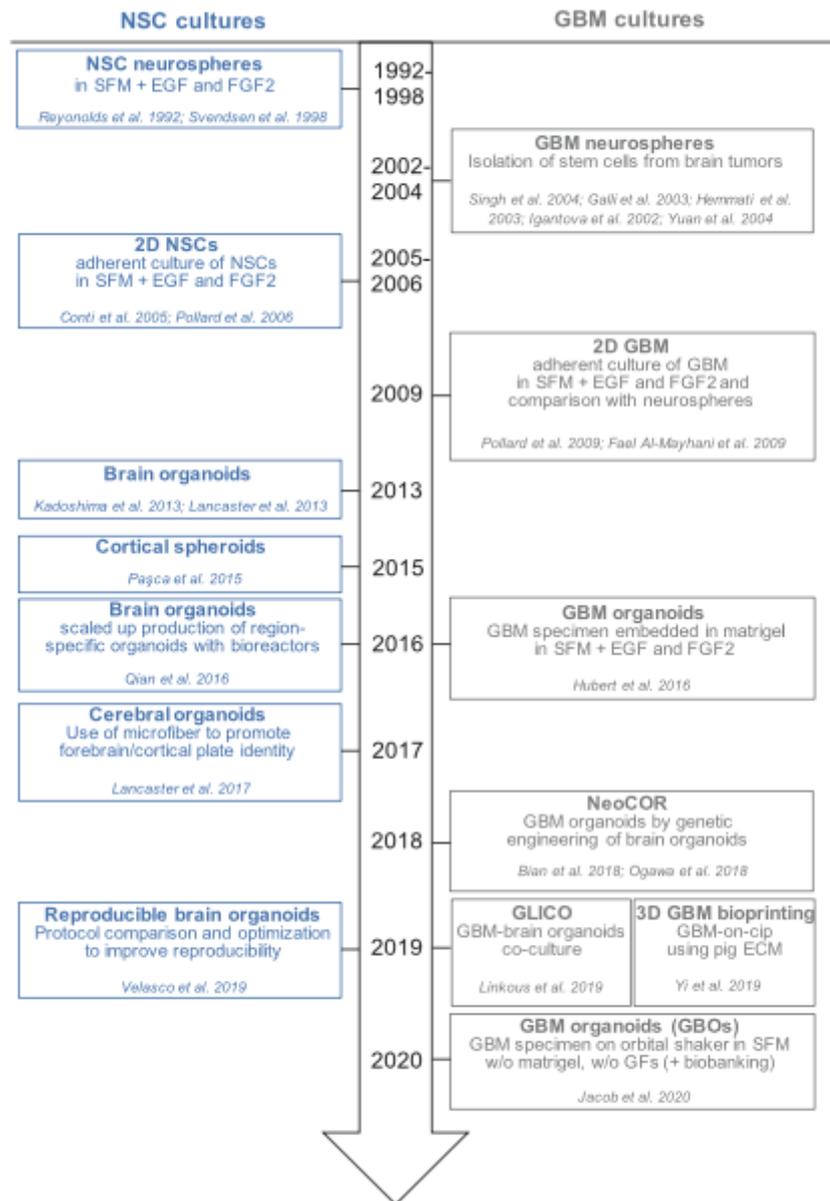


Figura 4: Nella tabella si osserva lo sviluppo di diverse metodologie di coltura di cellule staminali neurali e di cellule di GBM in forma di monolayer, sferoidi o organoidi [7]

cui si trovano.

Diverse popolazioni di SOX2+ dunque possono coesistere a dimostrazione che il microambiente dell'organoide è in grado di sostenere la crescita e lo sviluppo di differenti fenotipi cellulari rendendo possibile lo studio delle gerarchie cellulari

tumorali.

Nello studio pubblicato Jacob et al. [11] è riportato un metodo per ottenere organoidi derivanti dalle cellule tumorali del paziente (GBOs). Per preservare l'architettura e le interazioni cellula-cellula del tumore originale è stata evitata la dissociazione meccanica o enzimatica del tessuto, inoltre non sono stati utilizzati fattori di crescita o ECM artificiali che avrebbero potuto influenzare l'espressione genica. È stato invece utilizzato il tessuto prelevato dalla regione più periferica del GBM con una componente necrotica molto ridotta e una parte di tessuto nervoso circostante, è stato sezionato in frammenti di circa 1 mm e sono stati rimossi i componenti non cellulari e i globuli rossi. In figura 5 viene mostrato come vengono ottenuti e caratterizzati i GBOs e le possibili applicazioni di questo modello.

In 1-2 settimane i frammenti avevano formato gli organoidi che sono poi stati espansi tagliandoli in pezzi più piccoli (circa 0.5 mm) per evitare la formazione del core necrotico. In seguito sono state effettuate analisi istologiche per valutare se i GBOs rispecchiavano il fenotipo del tumore originario ed è stato osservato che effettivamente questi mostravano diverse caratteristiche morfologiche in comune: dalle analisi si evince il mantenimento dell'eterogeneità nell'identità e nella morfologia cellulare. Sono stati realizzati GBOs con elevato grado di affidabilità a partire da 53 pazienti; è stato osservato che questi mantengono l'espressione genica originale fino a 48 settimane. È stato sviluppato un protocollo per congelare le colture senza causare variazioni nell'espressione di determinati marker corrispondenti al tumore iniziale e dunque è stato possibile realizzare una bio-banca in cui sono stati raccolti 70 GBOs derivanti da 53 pazienti in grado di rappresentare le diverse mutazioni più comunemente osservate nel GBM. In seguito è stato effettuato il sequenziamento dell'RNA su 17 campioni tumorali e 64 GBOs da essi derivati, è stata osservata un'importante eterogeneità fra i diversi campioni, ogni campione risultava caratterizzato da un corredo genetico unico che veniva mantenuto nei GBOs corrispondenti. Successivamente gli 8 GBOs ottenuti da 7 diversi pazienti sono stati impiantati nel cervello di topi immunodeficienti e dopo circa 2 mesi dalle analisi è emerso che i tessuti esibivano architetture analoghe a quelle osservate in vivo nel tumore originario, in 3 casi sono stati sviluppati dei tumori satellite analogamente a quanto verificato in vivo nei pazienti. Questo conferma il mantenimento delle caratteristiche specifiche del tumore primario nel GBO. Sono state trovate popolazioni di cellule proliferative (KI67+) e cellule progenitrici (SOX2+ o NESTIN+) sia nel sito dello xenotrapianto che in regioni distanti. Questi risultati dimostrano che l'impianto di GBOs presenta diversi vantaggi rispetto ai metodi tradizionali, sia per quanto riguarda i tempi ridotti di ottenimento del modello sia per quanto riguarda l'efficienza del modello stesso.

In vitro i GBOs sono stati utilizzati per testare la risposta ai diversi trattamenti: 8 GBOs sono stati esposti alla radioterapia (10Gy) con somministrazione settimanale

temozolomide (TMZ, 50 μ M) in modo da simulare lo standard di trattamento. Gli effetti della terapia sono quindi stati quantificati misurando l'espressione di KI67, fattore precedentemente associato con un complessivo miglioramento della condizione dei pazienti. Sono stati testati anche altri trattamenti più specifici, in funzione delle alterazioni geniche identificate nel tumore originario. I risultati osservati dimostrano che i GBOs derivati da tumori differenti rispondono in maniera diversa ai vari trattamenti somministrati la cui efficacia è altamente correlata con le mutazioni specifiche.

Al momento i modelli disponibili per testare in vitro la terapia CAR-T non sono in grado di rispecchiare il grado di eterogeneità espresso dal GBM in vivo e dunque è difficile valutare l'efficacia di questo trattamento sui tumori solidi. Per testare l'utilità dell'immunoterapia sul GBM è stata utilizzata una co-cultura di GBO e cellule CAR-T, seguita da monitoraggio per 72 h. Dai risultati si osserva che le cellule CAR-T risultano abbastanza specifiche ma incapaci di eradicare completamente le cellule tumorali. Questo studio comunque dimostra l'efficacia dei GBO per testare velocemente i trattamenti farmacologici, inclusi quelli con le cellule CAR-T antigene-specifiche.

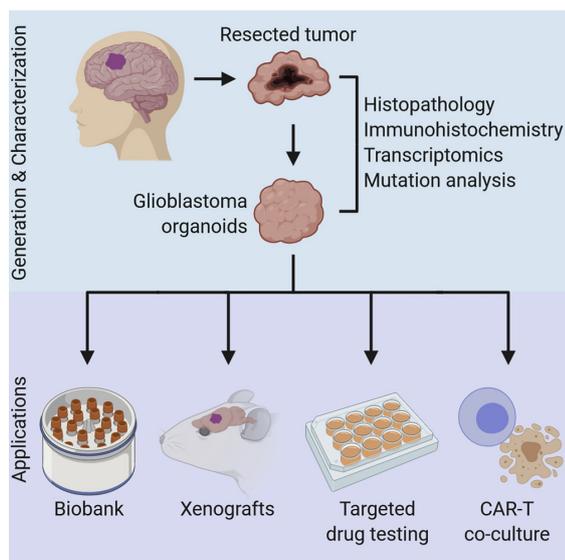


Figura 5: In figura sono schematicamente rappresentati lo sviluppo, la caratterizzazione e le applicazioni del GBO di Jacob et al. [11]

Recentemente è stato pubblicato da Sivakumar et al.[12] uno studio il cui obiettivo è l'individuazione e il tracciamento delle sotto-popolazioni di cellule tumorali che rispondono o resistono alle diverse tipologie di terapie. È stato utilizzato uno sferoide costituito da diversi fenotipi cellulari marcati con fluorofori

differenti in modo da analizzare i contributi delle singole linee cellulari nella reazione dell'organoide al trattamento farmacologico. In questo caso sono state utilizzate cellule di linea ma in futuro si potrebbe ripetere l'esperimento con cellule tumorali prelevate dai pazienti per mantenere la reale complessità e eterogeneità del tumore originario.

Gli organoidi tumorali, costituiti dalle quattro diverse linee cellulari, sono stati incapsulati all'interno di idrogeli. Successivamente sono stati somministrati i trattamenti farmacologici e sono state analizzate le variazioni dell'emissione in fluorescenza.

Dai risultati ottenuti si evince che l'eterogeneità intratumorale presente al momento della diagnosi è una condizione dinamica dipendente dal tempo e dal tipo di trattamento somministrato e generalmente questo processo è correlato allo sviluppo di una resistenza alla terapia.

In quanto risulta impossibile monitorare le dinamiche del GBM in vivo risulta di fondamentale importanza l'introduzione di un modello la cui evoluzione può essere monitorata nel tempo e in seguito alla somministrazione dei trattamenti.

Modelli tumorali ottenuti da organoidi cerebrali geneticamente ingegnerizzati

Nel 2018 Bian et al.[13] mediante l'induzione di mutazioni tumorigeniche su cellule cerebrali umane, hanno sviluppato un organoide geneticamente modificato (neoCOR) al fine di modellizzare le diverse fasi di crescita del tumore e le risposte agli stimoli esterni. Come si osserva in figura 6 gli autori hanno indotto la sovraespressione di oncogeni e soppresso l'attività di determinati geni sfruttando il sistema CRISPR-cas9. Sono state introdotte 18 fra le mutazioni più comunemente osservate in presenza di GBM, CNS-PNET pediatrico, tumore rabdoide teratoide atipico e medulloblastoma. A differenza dei modelli precedentemente sviluppati neoCOR prevede l'introduzione di alterazioni genetiche in una piccola percentuale di cellule, questa caratteristica non solo mima la nascita della patologia ma è anche in grado di riprodurre le interazioni che si creano fra il tessuto sano e quello malato e dunque questo modello risulta adeguato per lo studio dei meccanismi di invasività tumorale. Inoltre neoCOR può essere utilizzato per valutare l'effetto di diversi farmaci per il trattamento di tumori che presentano specifiche mutazioni genetiche. Come molti altri modelli però il principale limite di neoCOR è la mancanza di una rete vascolare. Una possibilità di superamento di questo ostacolo potrebbe essere la co-cultura di cellule della microglia e cellule endoteliali.

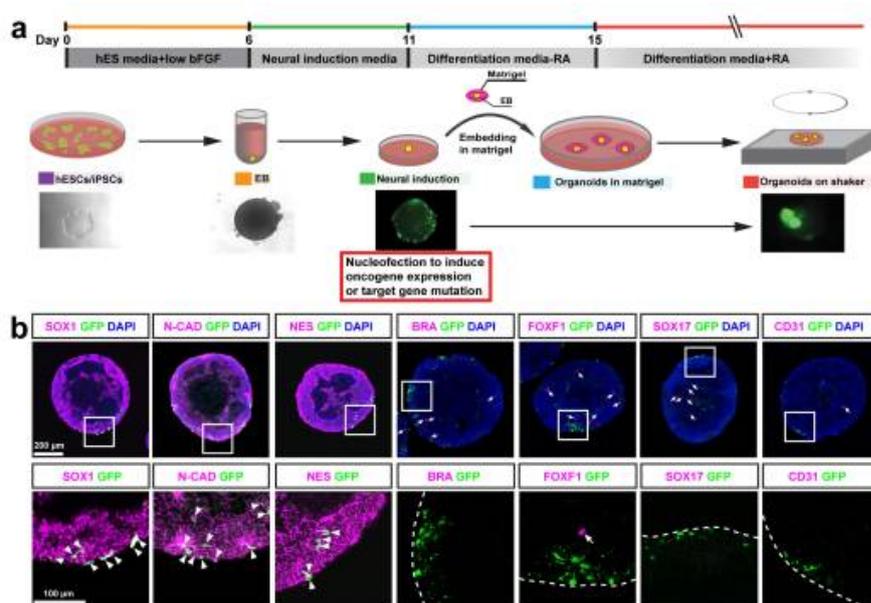


Figura 6: a. Rappresentazione schematica della coltivazione degli organoidi e del processo di nucleofezione. b. Vengono mostrate le immagini ottenute dopo aver effettuato lo staining delle sostanze indicate nelle singole figure [13]

Sempre nel 2018 è stato osservato da Ogawa et al. [14] la possibilità di indurre lo sviluppo di GBM attraverso precise alterazioni genetiche. Questo modello è molto utile per descrivere gli esordi della malattia in quanto basato sulla mutazione di poche sequenze geniche note che però non sono necessariamente rappresentative dell'intero genoma del GBM maturo.

Come si può osservare nella figura 7 gli organoidi sono stati ottenuti con il protocollo di Lancaster e Knoblich (2014), dopo circa 4 mesi di incubazione, hanno raggiunto la maturazione e hanno iniziato a mostrare le rosette neurali. Al termine della fase di maturazione la popolazione di cellule staminali neurali (SOX2+) risultava ridotta ma comunque presente. Anche in questo caso sono state indotte delle mutazioni genetiche localizzate. È stato osservato che negli organoidi di controllo le cellule in fase proliferativa erano il 3% mentre negli organoidi modificati il 18.6%, inoltre il 70.5% risultava positivo per il SOX2 mentre nel controllo solo il 35%. A 16 settimane dalla trasfezione l'86.8% dell'organoide era costituito da cellule tumorali, per verificare che si trattasse di cellule staminali di GBM sono state effettuate analisi istologiche. Le cellule modificate geneticamente mostrano una struttura mai vista prima, sono state osservate delle protrusioni di cellule tumorali uscenti dall'organoide analogamente a quanto è possibile notare in vivo. Per verificare l'identità delle cellule staminali tumorali sono state svolte le analisi istologiche che hanno confermato una maggiore espressione di OLIG2, SOX2 e della proteina

fibrillare acida della glia (GFAP).

Infine è stato testato il potenziale oncogeno in vivo, gli organoidi sono stati iniettati nell'ippocampo di topi immunodeficienti. Il tempo di sopravvivenza medio era di 90-100 giorni. Il tumore mostra elevata invasività e pleomorfismo nucleare, e diffusione attraverso la rete vascolare analogamente a quanto avviene nel GBM umano.

Dai risultati ottenuti è possibile dedurre che gli organoidi sviluppati hanno un potenziale oncogeno e rispecchiano le caratteristiche del tumore umano. Quindi risulta possibile indurre lo sviluppo di GBM umano all'interno degli organoidi cerebrali attraverso opportune modifiche genetiche, quali la sovra-espressione dell'oncogene HRasG12V e contemporaneamente la down-regolazione di TP53.

In questo modello mancano però alcune tipologie di cellule fondamentali per la patogenesi tumorale come le cellule endoteliali e le cellule della microglia ma, nonostante queste limitazioni, è stato dimostrato che organoidi cerebrali derivati da GSC umane possono supportare la tumorigenesi rispecchiando al meglio i comportamenti osservabili in vivo e dunque rappresentano un'interessante modalità di studio ex vivo dello sviluppo del GBM.

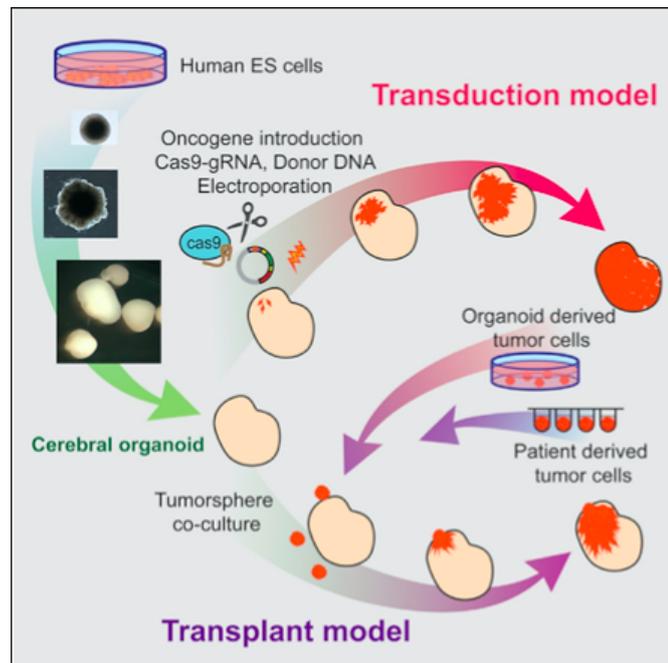


Figura 7: Protocollo di Ogawa et al. per lo sviluppo di organoidi cerebrali geneticamente modificati [14]

Co-cultura di cellule di GBM e organoidi cerebrali

Partendo dal presupposto che i tumori non sono semplicemente degli agglomerati di cellule ma dei sistemi complessi che interagiscono con il tessuto ospite, i modelli descritti fino ad ora rispecchiano determinati aspetti del GBM ma risultano fondamentalmente limitati.

Lo studio di Linkous et al. [15] propone la realizzazione di un modello innovativo in grado di mimare lo sviluppo del cervello umano. A partire dalla coltura di cellule staminali embrionali o cellule staminali pluripotenti indotte in condizioni tali da promuovere la formazione di neuroectoderma si può ottenere un “cervello miniaturizzato” (GLICO).

Gli organoidi mostrano un primitivo sistema ventricolare, diverse rosette neurali, cellule staminali neurali in proliferazione e il plesso coroideo differenziato. I risultati delle analisi morfologiche e immunoistochimiche suggeriscono che il livello di differenziamento osservato corrisponde circa a quello del cervello di un feto di 20 settimane, considerato che la presenza di determinati marker molecolari può non essere altamente specifica, è stato utilizzato il TEM per confermare la presenza di particolari tipologie di cellule quali cellule gliali e neuroni.

In figura 8 viene mostrato il protocollo per ricreare il GBM umano negli organoidi cerebrali: le cellule staminali tumorali (GSC) funzionalizzate con GFP sono state messe in coltura con gli organoidi cerebrali completamente sviluppati per 24 ore. A distanza di una settimana è stato possibile osservare una notevole crescita tumorale, successivamente una valutazione neuropatologica ha rivelato la presenza di uno strato di cellule staminali gliali che stava invadendo il tessuto sano analogamente a quanto osservabile nel GBM umano in vivo.

Con la microscopia a due fotoni è stato possibile notare la presenza di due regioni distinte all'interno dell'organoide: il bulk costituito esclusivamente da cellule tumorali e un'area periferica composta da cellule sane all'interno delle quali erano disperse delle cellule di glioma.

Le GSC sono state marcate con la luciferasi e messe in coltura con gli organoidi cerebrali per poter fare imaging in maniera non distruttiva e in real-time, la bioluminescenza rilevata era direttamente proporzionale al numero di GSC che stavano crescendo all'interno dell'organoide. Dopo due settimane l'invasione delle GSC aveva indotto la formazione di un'importante zona necrotica negli organoidi in parte causata dall'elevato rate proliferativo delle cellule tumorali.

Il microambiente tumorale in vivo ha grande influenza sulla risposta delle cellule in seguito alla somministrazione della chemioterapia e della radioterapia, questo effetto non è riprodotto nelle colture 2D ed è una delle cause per cui molti farmaci testati in vitro poi non risultano efficaci in vivo. Sono stati effettuati diversi test per dimostrare che GLICO è in grado di rispecchiare questa caratteristica e dunque

essere più adatto dei metodi di coltura tradizionale per individuare le terapie più adeguate. Sono stati utilizzati due agenti chemioterapici molto utilizzati in clinica: il temozolomide (TMZ) e la carmustina (BCNU). Nonostante siano stati osservati risultati estremamente incoraggianti nei test sulle GSC in coltura 2D, nel caso dei GLICO la riduzione della massa tumorale ottenuta è stata molto meno significativa. Anche nel caso del trattamento radioterapico i risultati ottenuti sugli organoidi si sono rivelati meno incoraggianti di quelli osservabili nelle colture su piastra. I dati ottenuti dimostrano quindi che le GSC sono significativamente più resistenti ai farmaci e alle radiazioni se crescono all'interno del microambiente tumorale rispecchiato dagli organoidi rispetto alla coltura bidimensionale.

Il modello GLICO dunque supera una serie di limitazioni legate ai modelli precedenti, permette di svolgere uno studio paziente-specifico *ex vivo* in un microambiente simile a quello nativo che si presta a diverse tipologie di sperimentazioni. Inoltre questo metodo è scalabile e quindi adatto per screening high-throughput.

Dunque GLICO rappresenta una grande opportunità per lo studio delle conseguenze della crescita del GBM sul tessuto neurale sano e per sviluppare e testare eventuali terapie innovative.

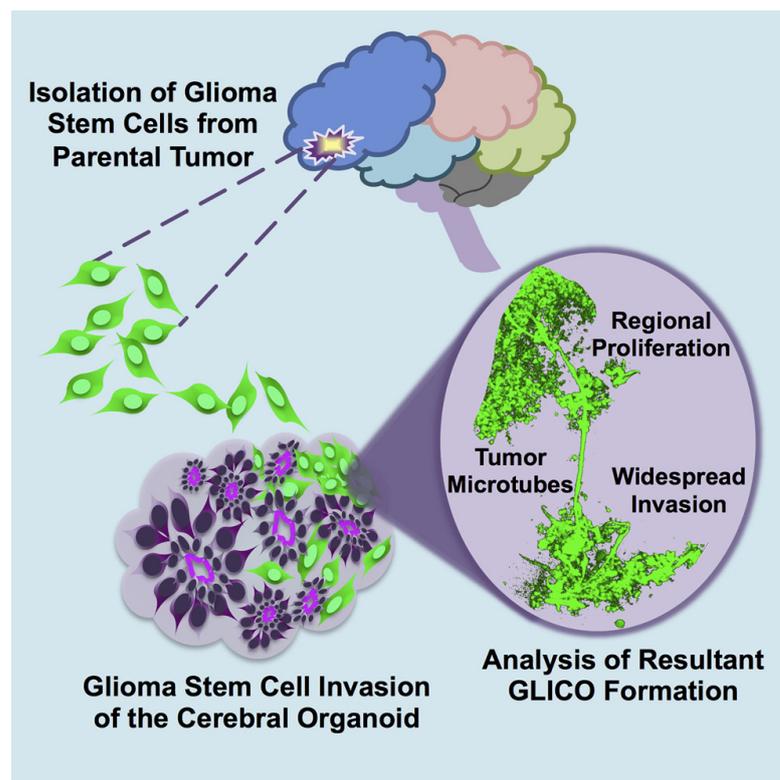


Figura 8: Rappresentazione schematica del protocollo di Linkous et al. per lo sviluppo di GLICO [15]

GBM on-a-chip

L'obiettivo dello studio di Akay et al. [16] è quello di sviluppare una tecnologia low cost che riesca a simulare il microambiente patologico del GBM per poter testare e quindi individuare la terapia ottimale per ogni singolo paziente. È stato costruito un GBM-on-a-chip su cui si sono sviluppati degli sferoidi a partire da linee cellulari di GBM commerciali. Inoltre mediante diversi canali microfluidici sono stati somministrati due diversi trattamenti chemioterapici a diverse concentrazioni. Mentre i risultati sulle cellule di linea sono stati molto incoraggianti, sono necessari ulteriori studi per quanto riguarda i campioni di GBM prelevati dai pazienti. Infatti, sebbene le cellule di linea siano molto utili nelle prime fasi dei test, esse presentano delle differenze sostanziali rispetto alle cellule dei pazienti. In questo studio si vuole dimostrare la capacità del GBM-on-a-chip di sviluppare sferoidi stabili e vitali a partire da cellule di GBM umane.

Il chip è costituito da un layer di idrogelo di PEGDA e PBS, ottenuto mediante un processo di fotolitografia UV, in mezzo a due lastre di vetro modificato per renderlo ultra-adesivo. Sul chip sono presenti due inlet e un solo outlet connessi tramite sette microcanali (100 μm di diametro) con 9-11 microwell (360 μm di diametro) per canale. È stato osservato che le piccole molecole riescono facilmente a diffondere attraverso la matrice porosa dell'idrogelo e quindi migrare da un canale all'altro. Per evitare questo fenomeno è stato previsto un gap di 600 μm fra i canali per prevenire la diffusione. Come mostrato in figura 9 l'efficacia di questo sistema è stata verificata mediante l'iniezione di due coloranti che non sono stati in grado di diffondere grazie alla presenza delle regioni di prevenzione.

Sono stati prelevati frammenti di tessuto tumorale da 3 pazienti e le cellule sono state coltivate in coltura 2D con mezzo di coltura endoteliale (EGM-2) che ha permesso lo sviluppo di diversi tipi cellulari come cellule tumorali e cellule endoteliali riflettendo effettivamente l'eterogeneità del tumore originario dopo di che le cellule sono state iniettate nel GBM-on-a-chip. Per caratterizzare le cellule del tumore primario è stata rilevata l'immunoreattività ai marker del GBM e l'immunofluorescenza per valutare l'espressione di VEGFR2 e GFAP.

Dopo aver introdotto le cellule i chip sono stati lasciati per 7 giorni a 37°C ed è stata monitorata la formazione degli sferoidi che si sono sviluppati in 1-3 giorni e hanno continuato ad aumentare in termini di densità cellulare per il tempo rimanente. Al termine del periodo di incubazione è stata riscontrata una vitalità cellulare del 95%.

Per determinare l'efficacia del chip nella valutazione del trattamento sono stati

utilizzati i due farmaci che vengono attualmente utilizzati in clinica (BEV³ e TMZ) che sono stati somministrati al termine dei sette giorni di sviluppo. Mediante analisi semi-quantitative è stata rilevata l'efficacia della combinazione dei due trattamenti, che hanno causato la diminuzione delle dimensioni degli sferoidi. Sono state inoltre riscontrate reazioni differenti in base al paziente da cui erano state prelevate le cellule. In ogni caso però è stata osservata una maggiore efficacia nel caso del trattamento con i farmaci combinati rispetto ai farmaci singoli.

Quindi il GBM-on-a-chip si è rivelato in grado di riflettere fedelmente il fenotipo del tumore originario, dimostrando che il microambiente tumorale svolge un ruolo fondamentale e quindi non trascurabile nella definizione della terapia in quanto ne influenza significativamente il risultato. Il chip inoltre ha adeguatamente sostenuto lo sviluppo di sferoidi tumorali, rappresenta un supporto stabile per la coltura non solo di cellule di linea ma anche di cellule umane prelevate dal tumore primario e dunque rappresenta un'importante innovazione per ottenere rapidamente informazioni sull'efficacia delle diverse opzioni di trattamento.

Dai risultati ottenuti è stato anche osservato che è stata mantenuta la variabilità fra i diversi tumori originari da cui sono state prelevate le cellule e dunque risulta possibile lo sviluppo di trattamenti specifici per il singolo paziente.

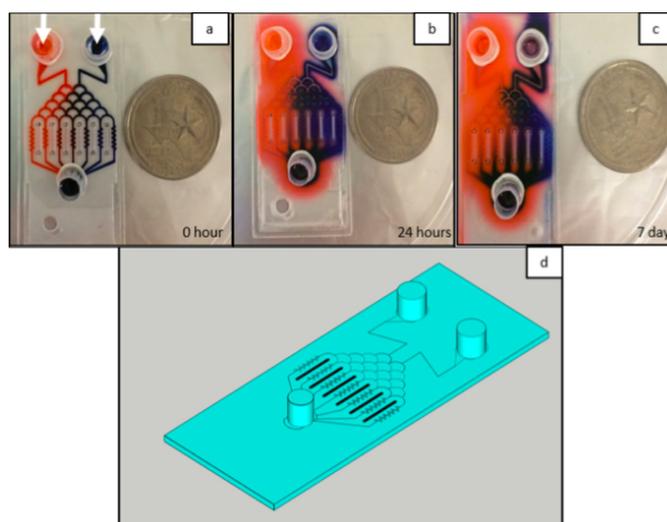


Figura 9: a. In figura viene rappresentato il chip all'interno del quale sono stati inseriti i coloranti ai diversi time-point, si può notare che i coloranti non sono in grado di diffondere attraverso la matrice dell'idrogel. b. Rappresentazione schematica del design del chip. [16]

³Bevacizumab: anticorpo monoclonale che agisce contrastando la crescita di nuovi vasi sanguigni nelle masse tumorali

Modelli di GBM realizzati con stampa 3D

I tumori indotti negli animali mediante lo xenotrapianto di cellule umane sono in grado di riprodurre fedelmente le caratteristiche del tumore da cui derivano ma non sono adatte per l'utilizzo in clinica in quanto richiedono tempi molto lunghi, costi elevati e problematiche di tipo etico. Dunque risulta necessario un modello ex vivo capace di riflettere le caratteristiche e quindi la risposta alla terapia del tumore da cui origina. Al momento sotto questo aspetto ci sono ancora molte difficoltà nella creazione di un modello in cui sia osservabile sia l'eterogeneità cellulare e molecolare che i segnali biochimici e biofisici presenti in vivo. Nello studio di Yi et al. del 2019 [17] viene proposta una strategia che si basa sull'utilizzo della stampa 3D per creare un sistema in grado di mimare le proprietà biochimiche e biofisiche del GBM che combina la presenza dello stroma, la generazione di un gradiente di concentrazione dell'ossigeno e l'utilizzo di matrice extracellulare decellularizzata creando in questo modo un GBM-on-a-chip. In figura 10 vengono schematicamente rappresentati i vari step di realizzazione del chip e la successiva applicazione.

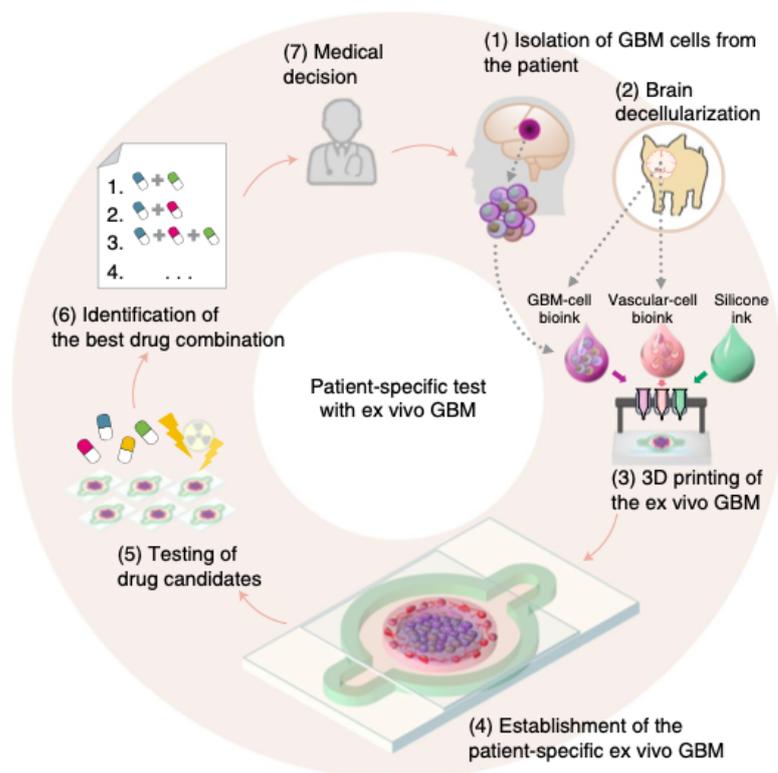


Figura 10: Applicazione del GBM-on-a-chip di Yi et al

In quanto la struttura dell'ECM risulta molto complessa da realizzare in laboratorio in questo studio è stata utilizzata matrice extracellulare decellularizzata porcina (BdECM). È stato osservato che le cellule tumorali coltivate nella struttura di BdECM mantengono l'espressione genica e le interazioni cellula-ECM tipiche del tumore originario in vivo.

In questo caso è stato sviluppato un bioink composto da dECM cerebrale porcina utilizzato come carrier protettivo per le cellule nel momento dello stampaggio e poi come matrice di supporto dopo la deposizione. Le cellule incapsulate nel bioink dopo 10 giorni erano rimaste vitali, con un'elevate rate di proliferazione e sovraesprimevano geni codificanti per fattori pro-angiogenici e proteine per la modellazione della matrice.

Il GBM-on-chip è stato realizzato stampando un anello esterno costituito da dECM porcina (BdECM) e cellule endoteliali prelevate dalla vena ombelicale all'interno del quale è stato stampato il bioink composto da BdECM e cellule di GBM. Dopo di che l'intero costruito è stato messo in incubatore a solidificare. È stato inoltre sviluppato un modello FEM per il calcolo della distribuzione dell'ossigeno che però varia in base all'attività cellulare. Pur cambiando il mezzo di coltura giornalmente il numero di cellule in condizioni di ipossia è aumentato mentre le cellule proliferanti sono diminuite.

Come si può osservare nella figura 11 è stato sviluppato un GBM-on-a-chip paziente-specifico isolando cellule prelevate da un GBM altamente invasivo che hanno mostrato una diversa sensibilità ai farmaci a seconda del tipo di bioink in cui erano state coltivate: le cellule che erano state stampate con la BdECM hanno mostrato una maggiore resistenza al cisplatino rispetto a quelle stampate con un gel di collagene ma risultavano più sensibili all'azione delle metalloproteasi-1 (TIMP-1).

Quindi dai risultati ottenuti si evince che i segnali biochimici della matrice decellularizzata influenzano fortemente la sensibilità delle cellule tumorali rispetto agli agenti anti-invasivi che inibiscono le interazioni cellula-ECM e quindi l'effetto sinergico della BdECM, dei gradienti di concentrazione dell'ossigeno e dell'organizzazione strutturale dei tessuti è cruciale per la riproduzione della patofisiologia originale del GBM.

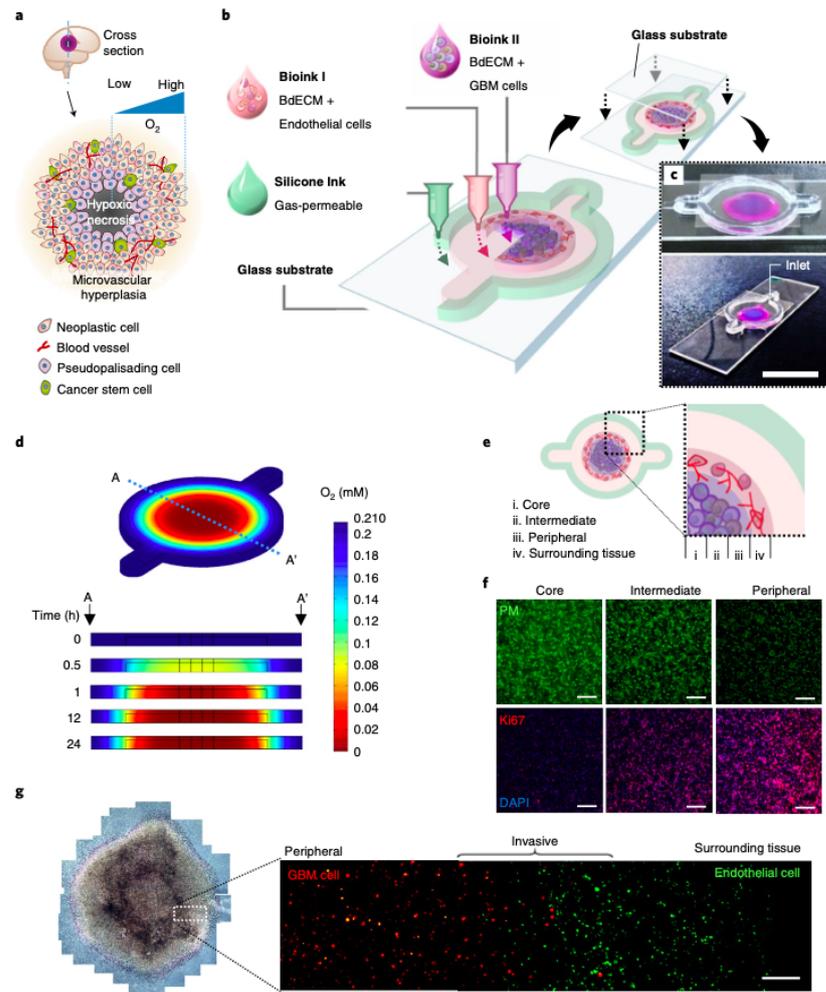


Figura 11: a. Rappresentazione schematica di una sezione trasversale di GBM. b. Illustrazione del processo di stampaggio del GBM-on-a-chip di Yi et al. c. Immagine del GBM-on-a-chip d. Mappa colorimetrica della concentrazione dell'ossigeno lungo la sezione trasversale del chip e. Rappresentazione schematica del core (i) e delle regioni intermedia (ii) e periferica (iii) del GBM stampato e dei tessuti circostanti (iv) f. Immagini dello staining immunologico nelle diverse regioni del chip g. Immagini rappresentative del GBM-on-a-chip ottenute con il microscopio ottico a contrasto di fase (sinistra) e con il microscopio a fluorescenza (destra).

I GBM-on-chip sono stati realizzati con cellule prelevate da GBM che manifestavano comportamenti molto variabili. I pazienti sono stati divisi in tre gruppi

- Gruppo X: pazienti che presentavano una resistenza medio-bassa al trattamento con TMZ e sono sopravvissuti per più di due anni

- Gruppo Y: pazienti che hanno mostrato una resistenza elevata al trattamento e sono sopravvissuti per meno di un anno
- Gruppo Z: pazienti che presentavano un tumore altamente aggressivo la cui progressione non è stata inibita dal trattamento

A partire da queste informazioni è stato valutato l'effetto del trattamento sulle cellule di GBM prelevate dai pazienti sia nel caso in cui queste si trovassero nel chip che nel caso in cui invece fossero state messi in coltura tradizionale (monolayer o sferoidi).

Sebbene sia stato riscontrato un risultato dipendente dal dosaggio di farmaco somministrato, nei sistemi convenzionali non è stato possibile osservare differenze fra cellule prelevate da pazienti appartenenti a gruppi differenti e le dosi di TMZ e radiazioni da somministrate risultavano estremamente ridotte rispetto a quanto osservato sul chip. Dunque dai risultati ottenuti si può supporre che la ricostruzione del microambiente tumorale comporti un aumento della resistenza alle terapie e una maggiore efficacia nella valutazione degli effetti dei trattamenti.

Inoltre il numero di cellule tumorali vitali in seguito al trattamento è risultato correlato con la sopravvivenza del paziente donatore e dimostrando che il GBM-on-a-chip riproduce in maniera accurata la resistenza al trattamento espressa dal tumore originario.

Da questo studio si evince che è possibile realizzare un modello di GBM mediante la stampa 3D depositando cellule tumorali e vascolari in un bioink costituito da BdECM creando così una struttura con un'organizzazione spaziale analoga a quanto osservabile in vivo inoltre utilizzando materiali con diversi gradi di permeabilità ai gas è stato inoltre possibile ricostruire il gradiente di concentrazione dell'ossigeno.

Il GBM-on-a-chip differisce dai modelli precedenti in quanto prevede lo sviluppo di un microambiente in grado di combinare fattori biochimici e biofisici rendendo possibile la definizione di piani di terapia specifici per il singolo paziente in tempi brevi e quindi utilizzabili in ambito clinico.

Obiettivo del lavoro

Il presente lavoro di tesi ha l'obiettivo di realizzare un modello 3D in vitro di GBM, che ne riproduca l'eterogeneità e la presenza di un articolato network vascolare.

A tale scopo è stato utilizzato un chip microfluidico commerciale (OrganoPlate® Graft, MIMETAS) strutturato in modo da poter ospitare al suo interno uno sferoide tumorale e da poter produrre una rete vascolare.

Per poter riprodurre la complessa composizione cellulare del GBM umano, sono stati realizzati diversi modelli sferoidali, andando a variare il rapporto fra diverse popolazioni cellulari. In particolare, si è scelto di includere, oltre alle cellule tumorali differenziate (U87-MG), le cellule della microglia (HMC-3), per valutare un eventuale cambio di fenotipo se poste in co-cultura con le cellule tumorali, e le cellule staminali tumorali (GBM-8). In questo modo diventa possibile andare a valutare l'influenza del microambiente tumorale sullo sviluppo del tumore.

L'effetto della presenza di più popolazioni cellulari sulla resistenza a farmaci chemioterapici è stato valutato in vitro, su colture 2D e 3D. In particolare, è stata valutata la resistenza al farmaco Bortezomib (BTZ), che ha mostrato un potente effetto citotossico su diverse popolazioni cellulari di GBM sia in vitro che in vivo.

Al contempo è stato ottimizzato il protocollo di formazione e sviluppo del network vascolare all'interno del chip, utilizzando cellule endoteliali cerebrali umane (HBEC-5i).

Il BTZ ha dimostrato di avere forti potenzialità antitumorali sia in vitro che in vivo ma non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. A tale scopo sono state realizzate e caratterizzate delle nanoparticelle polimeriche in grado di massimizzare l'accumulo del farmaco nel sito tumorale e ridurre gli effetti collaterali.

Il dispositivo ultimato, contenente il modello tumorale vascolarizzato, verrà utilizzato per valutare l'efficacia terapeutica del BTZ incapsulato all'interno delle nanoparticelle.

Il modello potrà essere successivamente implementato andando ad aggiungere ulteriori linee cellulari, come neuroni o astrociti, in modo da realizzare un dispositivo in grado di rispecchiare ancora più fedelmente quanto osservabile in vivo.

Capitolo 1

Materiali e Metodi

1.1 Materiali

1.1.1 Linee Cellulari

In questo studio sono state utilizzate quattro diverse linee cellulari umane: cellule tumorali, cellule della microglia, cellule endoteliali cerebrali e cellule staminali tumorali. Le cellule sono state splitate circa ogni 3 giorni.

U87 MG

Linea cellulare di glioblastoma primario umano ottenuta nel 1966 da una paziente donna di 44 anni. Presenta una morfologia epiteliale.

Le U87 MG sono state coltivate in MEM addizionato con il 10% di FBS, 1% di penicillina e 1% di streptomicina a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata.

HBEC-5i

Cellule endoteliali isolate da frammenti di corteccia cerebrale umana.

Le HBEC-5i sono state coltivate in PeproGrow™ Endothelial Cell Basal Medium addizionato con Growth Supplement-MicroV, a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata.

HMC-3

Le cellule della microglia sono state coltivate in MEM addizionato con il 12% di FBS, 1% di penicillina e 1% di streptomicina a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata.

GBM-8

Le cellule staminali tumorali sono state coltivate in Neurobasal Media (Gibco®) addizionato con: eparina (2mg/ml in PBS), 0,2% di B27, 0,05% di N2, 20 ng/ml di FGF e EGF e 1,4% di glutamina. Le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ umidificata.

1.2 Metodi

1.2.1 Colture cellulari

Coltura bidimensionale

Le cellule sono state coltivate all'interno di piastre da 96 pozzetti, 4000 cellule per pozzetto in 100 µl di mezzo. La piastra è stata mantenuta in incubatore per 24 ore per permettere la corretta adesione cellulare.

Le colture considerate in questo studio sono:

- Cellule tumorali differenziate (U87-MG)
- Cellule della microglia (HMC-3)
- Mix di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia in diversi rapporti

Coltura tridimensionale

Gli sferoidi sono stati realizzati utilizzando una piastra da 96 pozzetti con fondo ad U anti-adesiva, secondo il protocollo è schematizzato in figura 1.1.

Le cellule (4000 cellule/pozzetto) sono state piastrate in 100 µl di mezzo. La piastra è stata mantenuta in incubatore per 4 giorni al termine dei quali gli sferoidi erano completamente sviluppati.

Per analizzare eventuali cambiamenti nel comportamento delle diverse popolazioni cellulari se coltivate in coltura singola o in co-cultura sono state realizzate diverse tipologie di sferoidi. In particolare, i mix cellulari considerati in questo studio sono:

- Coltura singola di cellule tumorali differenziate (U87-MG)
- Coltura singola di cellule della microglia (HMC-3)
- Mix di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia in diversi rapporti (70/30; 50/50)
- Mix di cellule staminali tumorali e cellule tumorali differenziate (U87-MG +10% GBM-8)

- Mix di cellule staminali tumorali e cellule tumorali differenziate (10% GBM8) e cellule della microglia in diversi rapporti (70/30; 50/50)

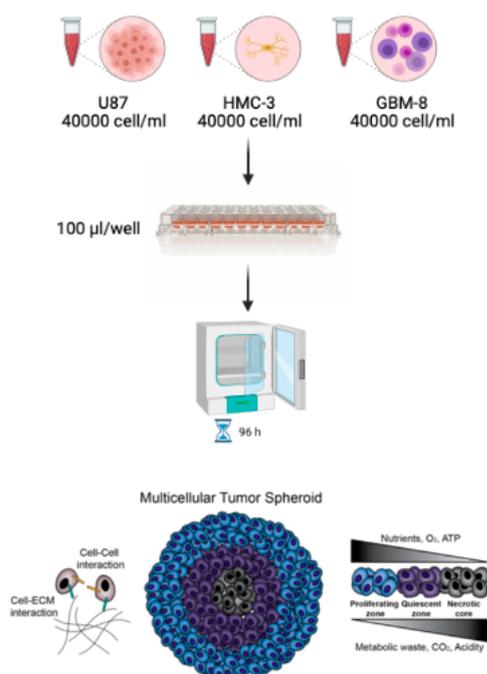


Figura 1.1: Rappresentazione schematica del protocollo utilizzato per la realizzazione degli sferoidi. I vari mix di popolazioni cellulari sono stati piastrati, nei rapporti desiderati, all'interno di una multi-well da 96 pozzetti con fondo ad U anti-adesiva e mantenuti in incubatore per 4 giorni. Immagine realizzata con BioRender.com

Trattamento farmacologico

Il farmaco utilizzato per questo studio è il Bortezomib (BTZ, Sellechem), farmaco chemioterapico che agisce inibendo la crescita tumorale, si tratta di un inibitore del proteasoma e dunque influisce su diverse proteine fondamentali per la regolazione del ciclo cellulare portando alla morte delle cellule neoplastiche.

In particolare, il trattamento con bortezomib agisce inibendo selettivamente il proteasoma 26S portando a un accumulo di proteine poliubiquitate all'interno della cellula che, in condizioni fisiologiche, verrebbero rapidamente smaltite. L'alterazione dei livelli di queste proteine induce una riduzione della proliferazione e della migrazione e un aumento dell'apoptosi delle cellule tumorali ([18] [19]).

In questo studio, il BTZ è stato solubilizzato in acetonitrile (1mg/ml). Per i trattamenti sono state considerate 4 diverse concentrazioni (50 nM, 20 nM, 10 nM e 2 nM) ottenute andando a diluire opportunamente la soluzione contenente il farmaco nel mezzo di coltura.

Saggio di vitalità

Per l'analisi della vitalità cellulare è stato impiegato il saggio Cell-Title-Glo (CellTiter-Glo®, Promega) che determina la lisi cellulare e la generazione di un segnale in luminescenza proporzionale alla quantità di ATP presente che risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti in coltura.

L'analisi è stata effettuata sia su colture 2D sia su colture 3D, per ogni popolazione cellulare sono state effettuate tre ripetizioni.

Una volta rimosso il mezzo di coltura sono stati effettuati due lavaggi con PBS ed è stato somministrato il reagente (100 µl per pozzetto). La piastra è stata poi messa in agitazione per indurre la lisi cellulare al riparo dalla luce per circa 10 minuti. Al termine del processo il contenuto della piastra è stato trasferito in una multi-well dal fondo opaco e nuovamente messa in agitazione per rimuovere eventuali bolle per circa 5 minuti e successivamente analizzata al lettore di piastre (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader). Il numero di cellule vitali viene fornito in rapporto al numero di cellule vitali presenti nei pozzetti di controllo, i dati sono presentati come la media e la deviazione standard delle tre ripetizioni. Le analisi sono state effettuate a 24, 48 e 96 ore dal trattamento. Il protocollo è schematizzato in figura 1.2.



Figura 1.2: Rappresentazione schematica del protocollo per la misurazione della vitalità cellulare. Le cellule sono state piastrate in una multi-well da 96 e trattate con il farmaco. Allo scadere dei time-points, dopo i lavaggi con PBS, è stato somministrato il reagente (CellTiter Glo®). Il segnale è stato analizzato con il lettore di piastre.

Immagine realizzata con BioRender.com

1.2.2 Realizzazione del modello

Il modello è stato sviluppato col supporto della piastra OrganoPlate® Graft, realizzata da MIMETAS. Si tratta di una multi-well contenente 64 chip ognuno dei quali costituito da 6 pozzetti. L'utilizzo di questo dispositivo supera le limitazioni

dei modelli precedenti in quanto rende possibile lo sviluppo di una rete vascolare fondamentale per l'apporto di nutrienti e eventualmente per la somministrazione del farmaco allo sferoide tumorale. Inoltre, sfruttando la microfluidica, è possibile realizzare modelli tridimensionali multicellulari su larga scala riducendo i costi. Ogni chip, schematizzato in figura 1.3, contiene al suo interno due canali di perfusione (indicati in figura 1.3 in rosso e in giallo) all'interno dei quali andranno ad aderire le cellule endoteliali formando i vasi. Al centro del chip si trova la graft chamber (indicata in blu in figura 1.3) in cui sarà introdotto un gel a base di collagene, caratterizzato in modo da mimare la matrice extracellulare, e successivamente, lo sferoide tumorale.

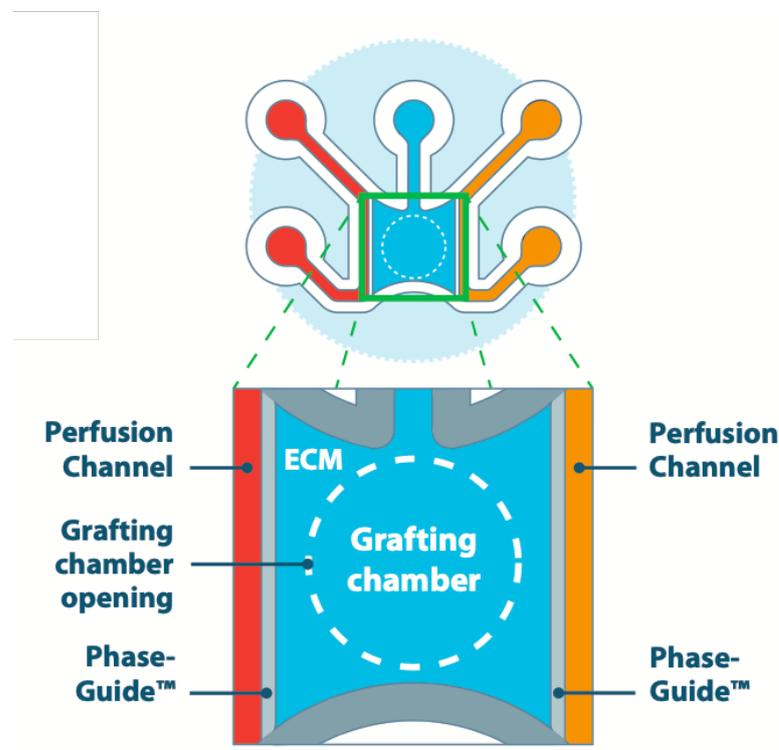


Figura 1.3: Schema chip OrganoPlate® Graft, MIMETAS

Sviluppo dei canali di perfusione

Per limitare l'adesione delle cellule endoteliali solo all'interno dei canali di perfusione è stato utilizzato un gel introdotto all'interno della graft chamber. Inizialmente è stato utilizzato lo stesso gel impiegato nei saggi di invasione (ViroGel® 3D) ma si è immediatamente rivelato inadeguato in quanto non abbastanza rigido per limitare l'invasione delle cellule endoteliali che, immediatamente dopo la semina,

tendevano ad aderire anche nel compartimento centrale del chip e non solo nei canali laterali. Per superare questa limitazione è stato realizzato un gel a base di collagene (Collagene-I 5 mg/ml, HEPES 1M, 37g/l NaHCO₃ in rapporto 8:1:1 rispettivamente) da introdurre nell'inlet della graft chamber (4 µl per chip). Il gel è stato poi lasciato in incubatore per circa 20 minuti in modo da permetterne la polimerizzazione.

Dopo aver ottenuto la composizione corretta del gel è stato possibile andare a ottimizzare il protocollo fornito per la realizzazione dei canali di perfusione.

La presenza del gel di collagene evita che le cellule endoteliali invadano la graft chamber nel momento della semina limitandone l'adesione nei soli canali di perfusione.

Secondo il protocollo fornito da MIMETAS non risulta necessario un rivestimento dei canali per permettere l'adesione delle cellule endoteliali. È stato osservato che, specialmente in seguito alla somministrazione dei fattori di crescita, queste tendono a migrare verso la graft chamber portando così alla perdita di struttura dei vasi.

Per permettere una migliore adesione alle pareti dei canali è stato effettuato un rivestimento con gelatina (2 µl negli inlet dei canali di perfusione). In alcuni casi però, la gelatina ha ostruito il canale bloccando le cellule all'interno dell'inlet. Per evitare l'ostruzione ma migliorare l'adesione le cellule sono state introdotte sospese all'interno di una soluzione di mezzo di coltura e gelatina (in rapporto 50:50).

Utilizzando il protocollo ottimizzato, le cellule sono state portate a una concentrazione di 10000 cell/µl in una soluzione di gelatina/mezzo di coltura (50/50). 2 µl di questa sospensione sono stati iniettati in ciascun inlet (4 µl per chip) e mantenuti in coltura statica per circa 24 ore in modo da permettere l'adesione delle cellule all'interno dei canali. Al termine delle 24 h la piastra è stata posta sul basculante all'interno dell'incubatore (37°C, 5% CO₂) per consentire la completa copertura del vaso. La completa copertura dei vasi ha richiesto all'incirca 5 giorni dopo di che sono stati somministrati i fattori di crescita come descritto in tabella 1.1 che hanno portato alla formazione dei capillari all'interno della graft chamber in circa 96 ore. I fattori di crescita sono stati diluiti nel mezzo di coltura PeptoGrow™ Endothelial Cell Basal Medium e sono stati somministrati 50 µl per chip all'interno della graft chamber.

Compound	Supplier	Stock	Final Concentration
rhVEGF-165	Peprotech	100 g/mL in 0.1% BSA in PBS	37.5 ng/mL
S1P	Sigma-Aldrich	1 mM in 95% DMSO 5% HCl 1M	250 nM
PMA	Sigma-Aldrich	10 g/mL 0.1% DMSO in MiliQ	37.5 ng/mL
rhFGFb	Peprotech	50 g/mL in 0.1% BSA in PBS	37.5 ng/mL
rhMCP-1	ImmunoTools	100 g/mL in 0.1% BSA in PBS	37.5 ng/mL
rhHGF	ImmunoTools	100 g/mL in 0.1% BSA in PBS	37.5 ng/mL

Tabella 1.1: Componenti del cocktail di fattori di crescita somministrati

Introduzione dello sferoide tumorale

La formazione dei capillari, indotta dalla somministrazione dei fattori di crescita, richiede dai 3 ai 7 giorni, al termine dei quali è stato introdotto lo sferoide tumorale direttamente nella grafting chamber.

È stato osservato che, a contatto con il gel di collagene presente all'interno della camera centrale, lo sferoide tende a rompersi e le singole cellule ad aderire sul substrato. Per mantenerne l'integrità, lo sferoide è stato trasferito nel chip incorporato all'interno del VitroGel® 3D.

Saggio di migrazione cellulare

Il saggio di migrazione cellulare è stato effettuato per verificare la capacità della matrice, realizzata utilizzando il VitroGel® 3D, di garantire l'integrità dello sferoide nel tempo prevenendone la rottura. Le co-culture su cui sono stati svolti i test sono:

- Coltura singola di cellule tumorali differenziate (U87-MG)
- Co-coltura di cellule tumorali differenziate e di cellule della microglia in diversi rapporti (70:30 e 50:50)

Per lo svolgimento del saggio di invasione è stato utilizzato il idrogelo di supporto VitroGel® 3D (TheWell Bioscience).

L'idrogelo utilizzato è ottenuto diluendo il VitroGel® 3D nella soluzione di diluizione (in rapporto 1:5 v/v) ed è stato mantenuto in incubatore per 30-60 minuti in modo da permetterne la polimerizzazione. Al composto così ottenuto sono stati aggiunti gli sferoidi.

La piastra è stata monitorata per i 7 giorni successivi con il microscopio confocale (Nikon ECLIPSE Ti2).

Immunostaining

Per eseguire lo staining all'interno del chip è stato seguito il protocollo fornito da MIMETAS. L'intera procedura di staining è stata effettuata a temperatura ambiente. Il mezzo è stato aspirato dal chip e sostituito con il fissativo (paraformaldeide, PFA 4% in PBS, 100 μ l negli inlet dei canali di perfusione e 50 μ l negli outlet e nella grafting chamber). Al termine dell'incubazione del fissativo (circa 15 minuti) sono stati effettuati 3 lavaggi (5 minuti ciascuno) con PBS. Sono stati aggiunti 50 μ l di permeabilizzante (0,3% Triton X-100 in PBS) per pozzetto e la piastra è stata lasciata in incubatore per 15 minuti. Al contempo è stato preparato l'anticorpo primario (Recombinant Anti-ZO1 tight junction protein antibody, ab221547 e Recombinant Anti-CD31 antibody, ab76533), diluito in blocking buffer (0,1% Triton X-100 in SuperBlock) in rapporto 1:500. Terminata l'incubazione il permeabilizzante è stato aspirato e sostituito con 40 μ l per pozzetto di soluzione contenente l'anticorpo e la piastra è stata lasciata in agitazione per tutta la notte. Il giorno successivo è stato somministrato l'anticorpo secondario (Goat Anti-Rabbit IgG HL (Alexa Fluor® 555) ab150078), diluito in blocking buffer in rapporto 1:200, e lasciato agire per 2 ore.

1.2.3 Preparazione delle nanoparticelle

Le nanoparticelle impiegate in questo studio presentano una struttura core-shell. Il guscio esterno è composto da due diversi fosfolipidi, L- α -fosfatidilglicerolo (EGG-PEG, Avanti® Polar Lipids) e 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG, Avanti® Polar Lipids). Il core è costituito da un poliuretano a base di policaprolattone. Per la realizzazione delle nanoparticelle (NP's) è stato seguito il protocollo schematizzato in figura 1.4. Sono state realizzate due soluzioni distinte:

- 2 ml di soluzione contenente i lipidi costituita da 200 μ l di DSPE-PEG in Etanolo al 10% , 200 μ l di EGG-PEG in etanolo al 10% in 1,560 ml di acqua distillata
- 1 ml di soluzione contenente il polimero costituita da 50 μ l di Bortezomib (BTZ 1mg/ml in acetonitrile), 100 μ l di soluzione contenente il poliuretano (10 mg/ml di acetonitrile) in 850 μ l di acetonitrile.

La soluzione lipidica è stata portata alla temperatura di 60°C sotto agitazione e, successivamente, è stata addizionata goccia a goccia la soluzione contenente il poliuretano.

La sospensione così ottenuta è stata trasferita all'interno di un filtro (Cut-off 10kDa) e centrifugata per circa 15 minuti a 3200 rpm. In seguito sono stati effettuati due lavaggi e le NP's sono state raccolte.

Per la realizzazione delle particelle fluorescenti il protocollo è il medesimo con l'aggiunta di 5 μ l di rodamina nella soluzione lipidica.

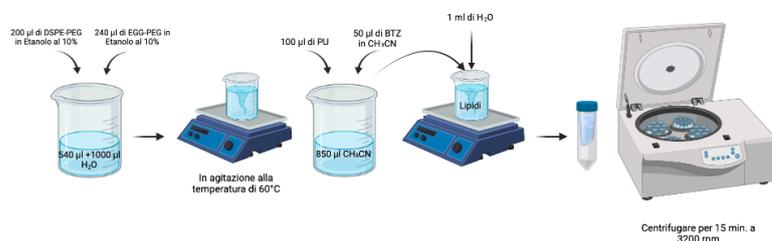


Figura 1.4: Per la preparazione delle NPs i lipidi vengono solubilizzati in acqua distillata e la soluzione ottenuta è portata a 60°C sotto agitazione. In questa condizione viene aggiunta la soluzione contenente il BTZ e il polimero in acetonitrile goccia a goccia. Il composto ottenuto viene trasferito in un filtro e centrifugato per 15 minuti a 3200 rpm.

Immagine realizzata con BioRender.com

1.2.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle

Dynamic Light Scattering (DLS)

La sospensione di nanoparticelle è stata analizzata con il DLS, una tecnica di misurazione non invasiva per la determinazione della dimensione delle particelle, dell'indice di polidispersità e del potenziale Z.

La dimensione è stata calcolata in termini di diametro idrodinamico che corrisponde al diametro di un'ipotetica sfera che diffonde in soluzione con la stessa velocità della particella di interesse. Questo parametro dipende dal tipo di soluzione in cui è disperso il campione, dalla dimensione del core della particella e dalle caratteristiche superficiali.

L'analisi col DLS fornisce una distribuzione di dimensioni delle particelle, l'indice di polidispersità (PDI), con un valore compreso fra 0 e 1, determina l'uniformità della distribuzione. Bassi valori di PDI indicano una distribuzione molto uniforme, mentre valori prossimi a 1 indicano un'elevata disomogeneità delle particelle.

È stata anche effettuata la misurazione del potenziale Z che definisce la stabilità della sospensione. Per stabilire il potenziale Z viene misurata la velocità del moto delle particelle dovuto alla presenza di un campo elettrico. Un potenziale Z elevato (in modulo) è indice di una sospensione stabile in quanto le forze repulsive fra le particelle ostacolano la formazione di aggregati.

Le stesse analisi sono state effettuate sia sulle particelle vuote sia su quelle cariche di farmaco. I campioni sono stati sospesi in acqua e per effettuare la misurazione è stato utilizzato un Litesizer™ 500 (Anton Paar).

Spettroscopia UV/Vis

È stato utilizzato lo spettrofotometro UV/Vis per esaminare i rilasci delle nanoparticelle.

Dopo aver realizzato le nanoparticelle, seguendo il protocollo precedentemente descritto, queste sono state mantenute in incubatore. A timepoint prestabiliti la soluzione contenente le nanoparticelle è stata centrifugata (10000 rpm per 10 minuti) ed è stato prelevato il surnatante contenente il farmaco rilasciato dalle nanoparticelle. Questo è stato congelato e liofilizzato. I rilasci sono stati raccolti per 7 giorni dalla preparazione delle nanoparticelle.

Sono stati preparati gli standard a diverse concentrazioni di BTZ (100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml e 10 µg/ml) ed è stata calcolata la retta di calibrazione.

Il BTZ rilasciato dalla nanoparticelle è stato solubilizzato in 500 µl di acetonitrile e i campioni sono stati analizzati con lo spettrofotometro. L'analisi è stata effettuata a 320 nm.

Saggio di perfusione

Per valutare l'integrità della parete vascolare ottenuta nel canale, sono state realizzate delle nanoparticelle funzionalizzate con un fluoroforo (rodamina). Le nanoparticelle (diametro idrodinamico medio: 117 nm) sono state centrifugate e risospese in 1 ml di mezzo di coltura. Sono stati introdotti nell'inlet del canale 50 µl di soluzione.

Capitolo 2

Risultati e Discussione

2.1 Colture cellulari

2.1.1 Analisi della risposta al BTZ in colture bidimensionali

In figura 2.1 sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità cellulare effettuato sulle cellule coltivate in 2D ed esposte a concentrazioni crescenti di BTZ per diversi timepoints.

Si osserva che le cellule della microglia in coltura singola (fig.2.1A) sono particolarmente sensibili al farmaco e la loro vitalità decresce sensibilmente già alla concentrazione 10 nM (69% dopo 24 ore e 8% dopo 48h).

Per quanto riguarda invece le cellule tumorali (U87-MG, figura2.1B) si osserva una buona sensibilità al farmaco, dipendente dalla concentrazione dello stesso e dalla durata del trattamento. In particolare, il farmaco non sembra causare effetti dopo 24 ore di incubazione, mentre dopo 48 ore di incubazione la vitalità decresce del 45% e del 60% rispetto al controllo, rispettivamente per le concentrazioni di 20nM e 50nM. Le stesse concentrazioni producono un effetto tossico ancora maggiore dopo 72 ore di incubazione, quando la vitalità decresce del 58% e del 78% rispetto al controllo.

Per quanto riguarda la risposta al trattamento della co-cultura di cellule tumorali U87 (fig.2.1B) con le cellule della microglia (fig.2.1C e 2.1D), si osservano alcune differenze rispetto alla coltura singola. In particolare, la maggiore sensibilità al farmaco delle microglia, si riflette in una più marcata riduzione della vitalità cellulare rispetto al trattamento sulle sole U87.

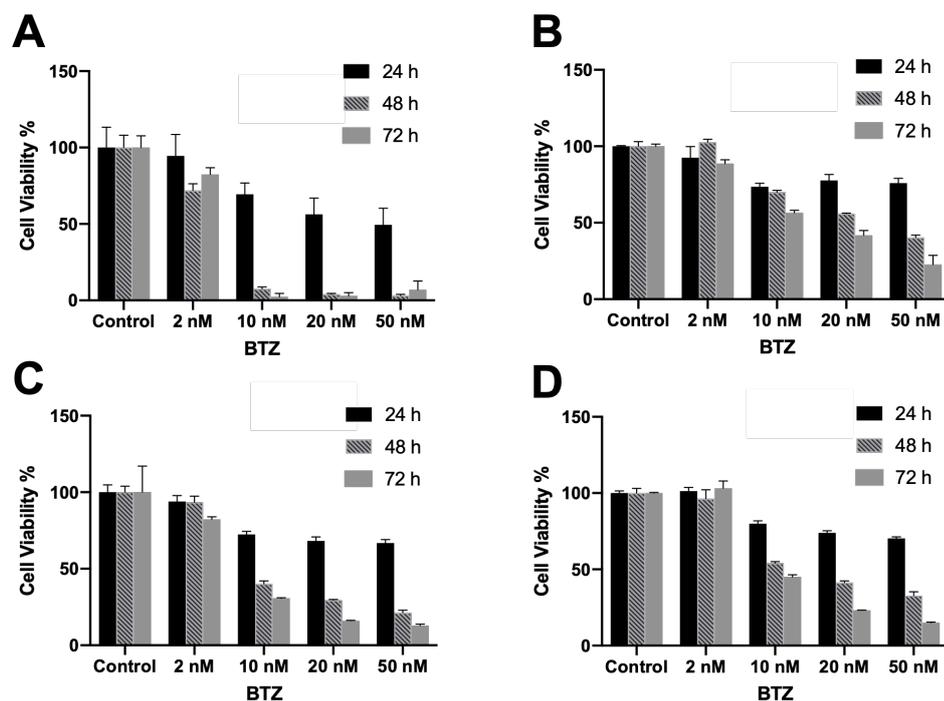


Figura 2.1: Nei grafici sono mostrati i risultati del saggio di vitalità effettuati sulle colture singole di cellule della microglia (A) e cellule tumorali differenziate (B) e sulle co-culture bidimensionali di U87-MG e HMC-3 in rapporto 70:30 (C) e 50:50 (D)

Quanto osservato è meglio descritto nel grafico in figura 2.2, dove sono confrontati i dati di vitalità cellulare alle concentrazioni di BTZ pari a 10nM, 20nM, e 50nM, per le sole U87 e le co-culture.

In particolare, si osserva una significativa diminuzione della vitalità cellulare ($p < 0.01$) alla concentrazione di 10 nM (fig.2.2A) per le co-culture rispetto alle sole U87-MG dopo 48 ore e 72 ore di incubazione.

All'aumentare della concentrazione di BTZ a 20nM (fig. 2.2B) e 50 nM e (fig. 2.2C) la diminuzione della vitalità cellulare nelle co-culture rispetto alle sole U87 si mantiene significativa ma emergono delle differenze in base al rapporto fra le diverse popolazioni cellulari. Per quanto riguarda le co-culture trattate con una concentrazione di BTZ pari a 20 nM (fig.2.2B) si osserva una riduzione significativa della vitalità cellulare a 48 ore e 72 ore dalla somministrazione per entrambi i rapporti mentre a 24 ore dal trattamento la riduzione di vitalità risulta significativa solo nel caso della co-cultura costituita da un maggior numero di cellule della microglia (50/50).

Sembra quindi che in coltura 2D l'effetto citotossico del BTZ non si modifichi in

presenza di co-culture di più cellule, e che si mantenga l'aumentata tossicità verso le cellule della microglia.

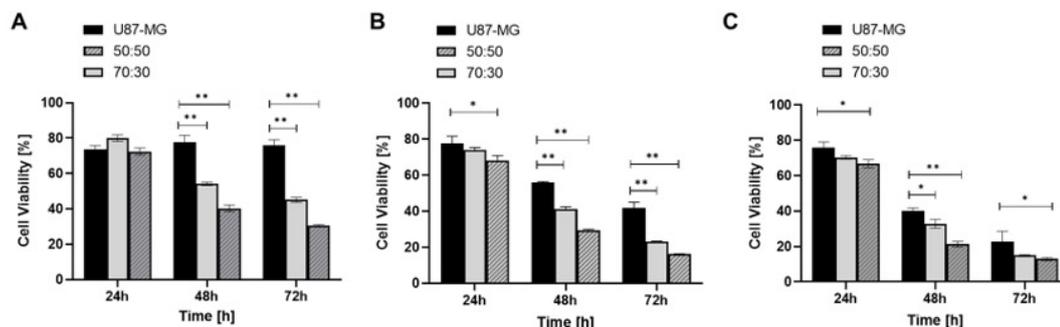


Figura 2.2: Nei grafici sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità sulle colture bidimensionali trattate con diverse concentrazioni di BTZ (10nM, 20nM e 50nM rispettivamente A,B e C)

La maggiore tossicità sulle microglia viene confermata anche dalle analisi al microscopio in fluorescenza (ZOE™ Fluorescent Cell Imager) sulle co-culture bidimensionali, in cui sono state utilizzate cellule tumorali differenziate marcate con la proteina fluorescente GFP (U87-GFP) (Fig.2.3).

Nelle immagini in figura 2.3 sono rappresentate le co-culture di cellule tumorali differenziate GFP positive e cellule della microglia nei rapporti considerati (50/50 e 70/30) a 24 ore (fig. 2.3A), 48 ore (fig 2.3B) e 72 ore (fig 2.3C) dalla somministrazione del BTZ. Si osserva che al momento del trattamento le cellule della microglia presentano una morfologia allungata, analoga a quanto si osserva quando si trovano il coltura singola. Inoltre fino a 72 ore dal trattamento sono ancora presenti cellule GFP positive e dunque cellule tumorali vitali (anche se in numero ridotto rispetto ai timepoint iniziali, in accordo con i test di vitalità) ma già al primo time-point si possono osservare delle cellule non GFP positive che presentano una conformazione ameboide.

Sulla base dei risultati dei test di tossicità e di quanto osservato, a livello qualitativo, al microscopio a fluorescenza, è possibile supporre che la variazione di morfologia sia concomitante con la morte delle cellule della microglia.

Dunque, dai risultati osservati sembra che il trattamento con BTZ, somministrato in forma di farmaco libero a diverse concentrazioni (10 nM, 20 nM e 50 nM), eserciti un'azione più rapida sulle cellule della microglia.

Alla luce di queste considerazioni si ritiene che la co-cultura 2D tra cellule tumorali differenziate (U87-MG) e cellule della microglia (HMC-3), non alteri il comportamento citotossico del farmaco, in quanto non è osservabile alcun effetto protettivo di una popolazione cellulare rispetto all'altra.

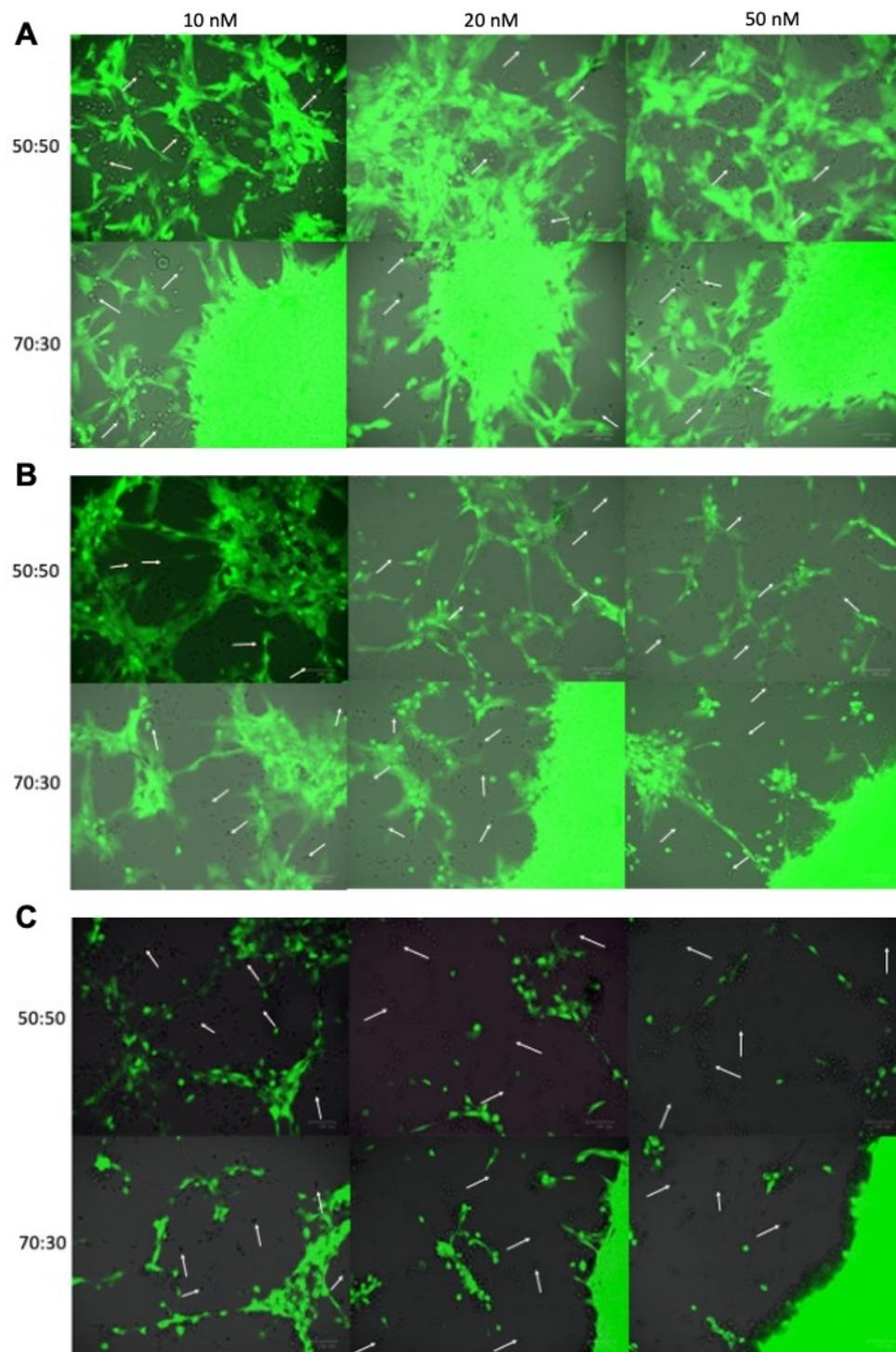


Figura 2.3: Le immagini rappresentano le co-cultura di cellule della microglia e cellule tumorali differenziate GFP+ nei due rapporti analizzati (50/50 e 70/30) trattate con diverse concentrazioni di BTZ a 24h (A), 48h (B) e 72h (C) dal trattamento. Scale bar 100 μ m

2.1.2 Analisi della risposta al BTZ in colture tridimensionali

Le analisi appena descritte in coltura bi-dimensionale, sono state ripetute su colture 3D, ovvero su sferoidi mono e multi-cellulari. Dalle immagini riportate (fig.2.4-2.7), in cui sono rappresentati gli sferoidi trattati con diverse concentrazioni di BTZ nei tre time-point considerati e i rispettivi risultati del saggio di vitalità, si osservano delle differenze sostanziali rispetto alla coltura bidimensionale.

Le cellule delle microglia in coltura singola 3D (fig.2.4) non esprimono una resistenza al trattamento maggiore rispetto a quanto osservato in coltura 2D. Trattando con le medesime concentrazioni di BTZ la vitalità riscontrata nelle colture 3D risulta addirittura inferiore a quanto osservato in coltura 2D. Ad esempio in seguito alla somministrazione del BTZ (10 nM) in coltura 2D la vitalità decresce del 30,6% a 24 ore, del 92,4% a 48 ore e 97,5% a 72 ore dal trattamento mentre in coltura 3D i valori di vitalità osservati si riducono ulteriormente del 67,8% a 24 ore, 98,8% a 48 ore e 99,8% a 72 ore. Per concentrazioni maggiori di BTZ (20 nM e 50 nM) è stato osservato un andamento analogo.

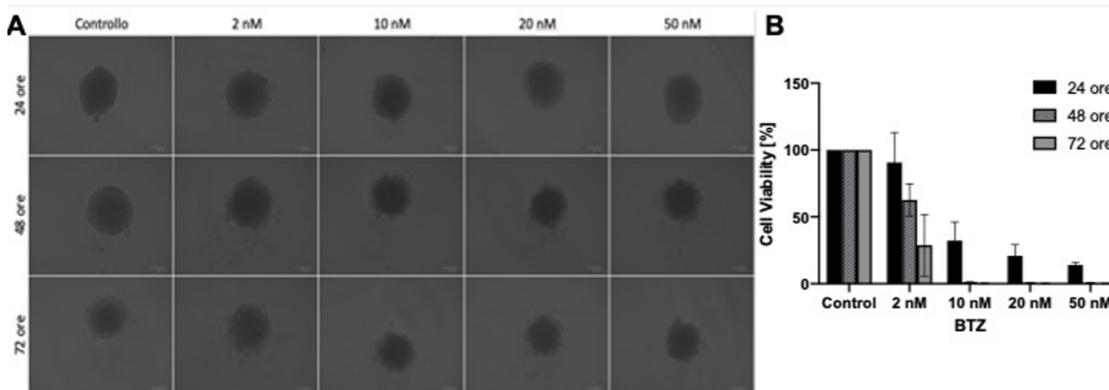


Figura 2.4: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla coltura singola di cellule della microglia e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μ m

La medesima considerazione è valida anche per la coltura singola di cellule tumorali differenziate (fig.2.5) anche se in questo caso, la differenza di vitalità cellulare fra la coltura bidimensionale e la coltura tridimensionale, risulta più marcata. In seguito alla somministrazione del trattamento (BTZ, 10 nM) in coltura 2D è stata rilevata una vitalità cellulare del 73,5%, 69,9% e del 56,6% a 24 ore, 48 ore e 72 ore dalla somministrazione. Nel caso della coltura 3D trattata con la medesima concentrazione di farmaco non è stata riscontrata una variazione di

vitalità cellulare rispetto al controllo nelle 24 ore successive alla somministrazione, mentre a 48 ore e 72 ore dal trattamento è stata misurata una vitalità cellulare rispettivamente del 70,9% e dell'80,2%.

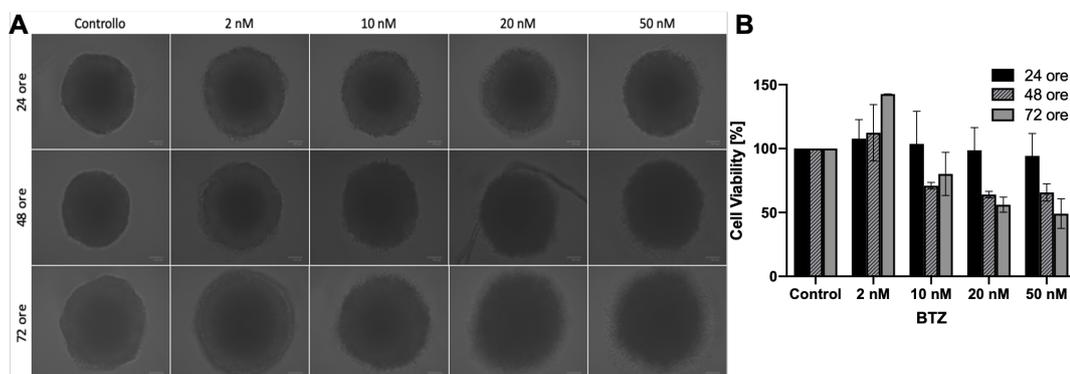


Figura 2.5: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla coltura singola di cellule tumorali differenziate e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μ m

Per quanto riguarda le co-colture (fig.2.6 e 2.7), invece, sembra che le cellule della microglia acquisiscano una maggiore resistenza al trattamento se in coltura con le cellule tumorali differenziate. Infatti, confrontando i risultati del saggio di vitalità effettuato sulle sole cellule tumorali differenziate e sulle co-colture, non sussistono delle differenze significative in termini di resistenza al trattamento per nessuna delle concentrazioni di BTZ considerate, come si osserva nei grafici riportati in figura 2.8, a differenza di quanto osservato in coltura 2D (fig. 2.2). Si suppone dunque che le cellule tumorali esercitino un'azione di protezione nei confronti delle cellule della microglia se coltivate in coltura tridimensionale.

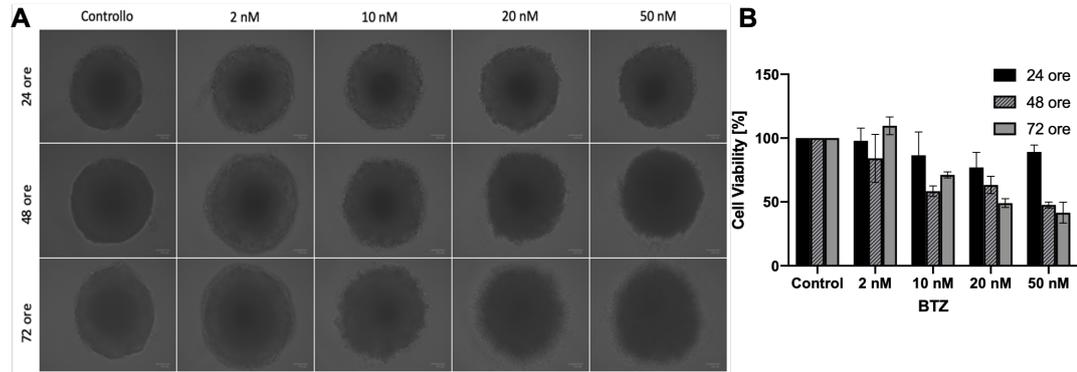


Figura 2.6: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia (50:50) e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μ m

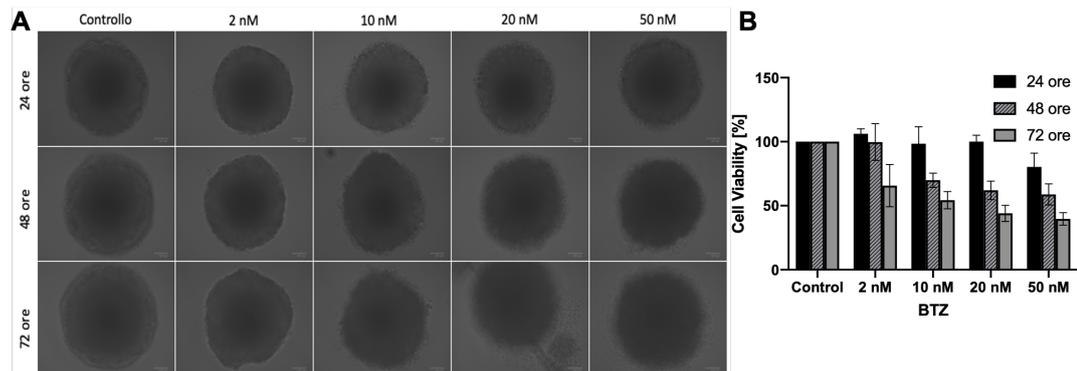


Figura 2.7: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia (70:30) e i rispettivi risultati del saggio di vitalità. Scale bar 100 μ m

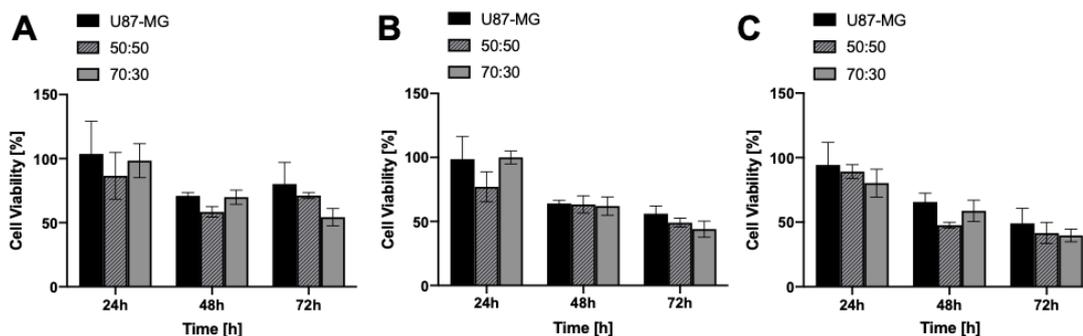


Figura 2.8: Nei grafici sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità sulle colture tridimensionali trattate con diverse concentrazioni di BTZ (10nM, 20nM e 50nM rispettivamente A,B e C)

Colture 3D in presenza di cellule staminali tumorali

Poiché il GBM è caratterizzato da elevata eterogeneità e, in particolare, dalla presenza di cellule staminali tumorali, la consistenza del modello tumorale 3D è stata aumentata includendo anche cellule staminali tumorali derivate da GBM umano (GBM-8) in percentuale pari al 10% sul totale di cellule tumorali.

Pertanto, sono stati realizzati sferoidi a base di U87/GBM8 e di U87/GBM8 in combinazione con le cellule della microglia nelle percentuali testate in precedenza (30% e 50%). Sferoidi di sole GBM8 sono stati utilizzati come controllo.

In figura 2.9 sono riportati i risultati dei test di vitalità effettuati sugli sferoidi. Si osserva che ad alte concentrazioni di BTZ (50 nM) la coltura singola di cellule staminali tumorali presenta una resistenza al farmaco molto ridotta già a 48 ore dal trattamento. Mentre la presenza delle cellule staminali tumorali all'interno delle co-culture non sembra comportare variazioni significative di vitalità rispetto a quanto osservato dai risultati delle stesse analisi effettuate sugli sferoidi costituiti da sole cellule tumorali differenziate e cellule della microglia.

Quanto osservato potrebbe significare che le cellule staminali tumorali non sono in grado di sopravvivere autonomamente, e quindi in coltura singola, ma agiscono all'interno del microambiente tumorale, come affermato dallo studio di Lathia et al.[20].

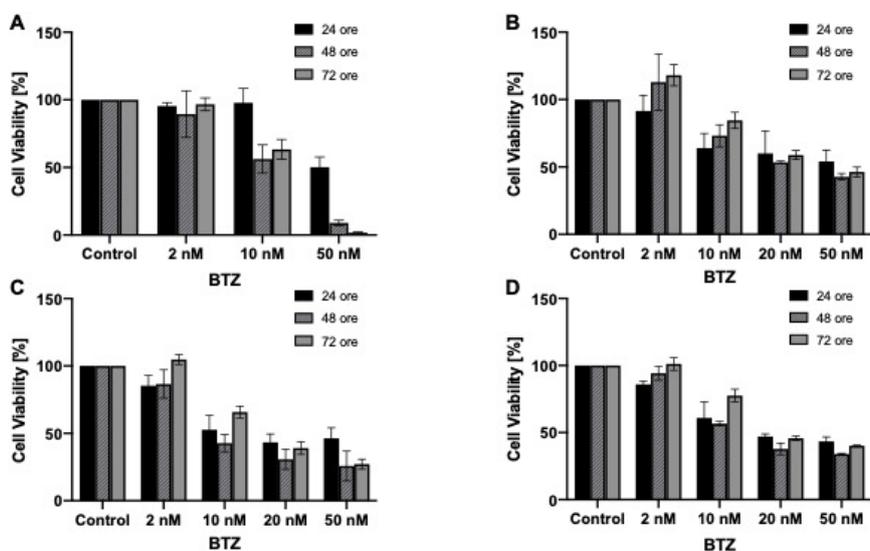


Figura 2.9: In figura sono riportati i risultati dei test di vitalità effettuati sugli sferoidi costituiti da cellule staminali tumorali (A), cellule tumorali differenziate e cellule staminali tumorali (90:10 (B)) e cellule staminali tumorali, cellule tumorali differenziate e cellule della microglia in rapporto 50:50 (C) e 70:30 (B)

In figura 2.10 sono riportati i risultati del saggio di vitalità effettuato sulle co-culture 3D in cui sono state introdotte le cellule staminali tumorali. Si osserva che l'introduzione delle cellule staminali tumorali comporta differenze significative in termini di variazione di vitalità cellulare rispetto al controllo costituito da sole cellule tumorali differenziate solo quando il trattamento con BTZ viene somministrato a una concentrazione intermedia (20 nM, fig. 2.10B) e solo nel caso della co-cultura a maggior numero di cellule tumorali (70:30). Inoltre, la riduzione di vitalità cellulare, è stata ritenuta significativa solo a 24 ore e 48 ore dalla somministrazione del trattamento ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ rispettivamente). Per tutti gli altri casi presi in considerazione la presenza all'interno delle co-culture delle cellule staminali tumorali non ha influito sulla resistenza al trattamento dello sferoide in maniera statisticamente significativa.

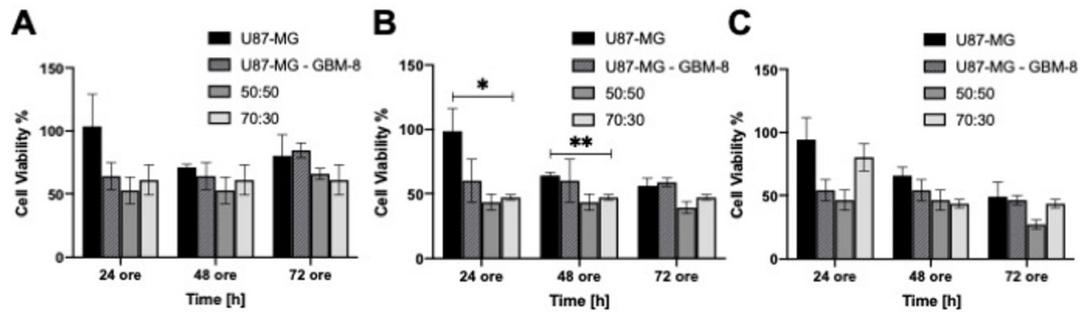


Figura 2.10: Nei grafici sono rappresentati i risultati del saggio di vitalità sulle co-culture tridimensionali in presenza di cellule staminali tumorali, trattate con diverse concentrazioni di BTZ (10nM, 20nM e 50nM rispettivamente A,B e C)

Nelle figure 2.11, 2.12 e 2.13 sono rappresentate le immagini acquisite con il microscopio a fluorescenza degli sferoidi trattati con le diverse concentrazioni BTZ ai tre time-point considerati.

Nelle immagini sono chiaramente evidenti delle zone più scure al centro dello sferoide che indicano la presenza delle cellule staminali. Si osserva che le cellule staminali tumorali tendono a organizzarsi in cluster ad elevata densità cellulare. Il medesimo comportamento è evidente in figura 2.13 in cui sono state impiegate, nella realizzazione degli sferoidi, le cellule staminali tumorali marcate con la proteina fluorescente GFP.

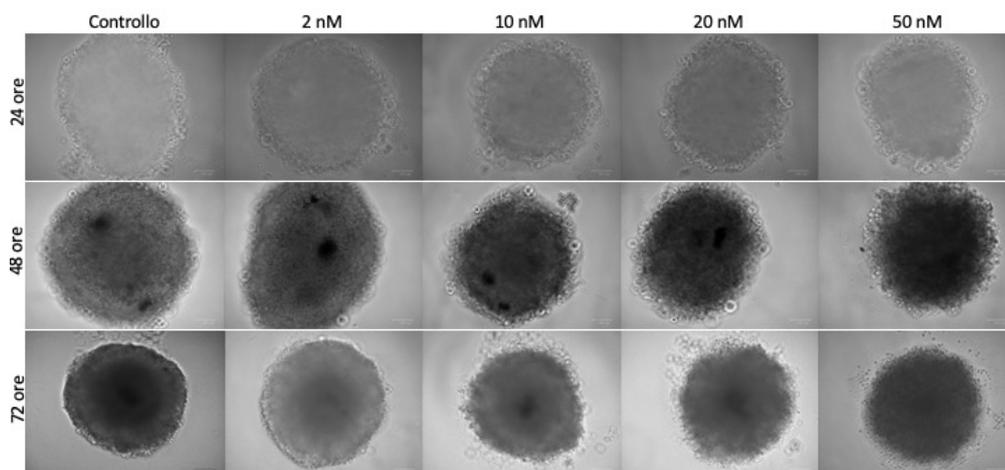


Figura 2.11: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule staminali tumorali (90:10). Scale bar 100 μ m

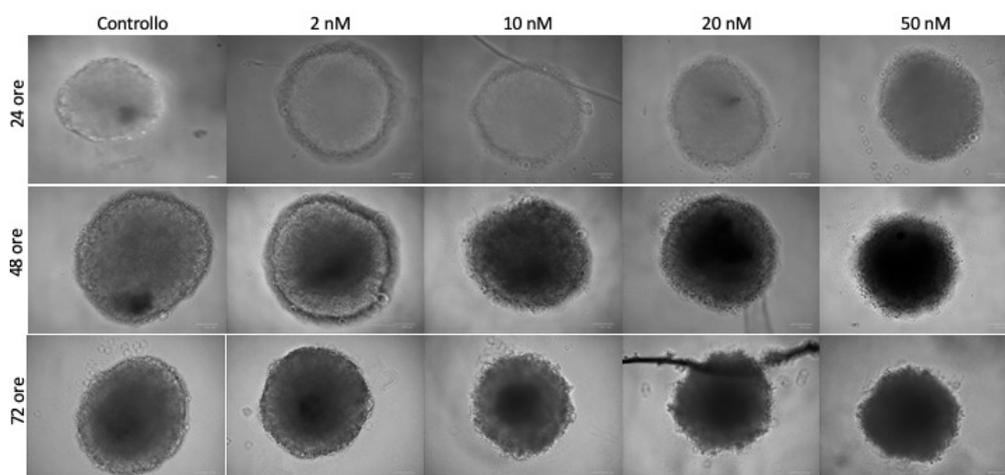


Figura 2.12: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate, cellule staminali tumorali e cellule della microglia (50:50). Scale bar 100 μ m

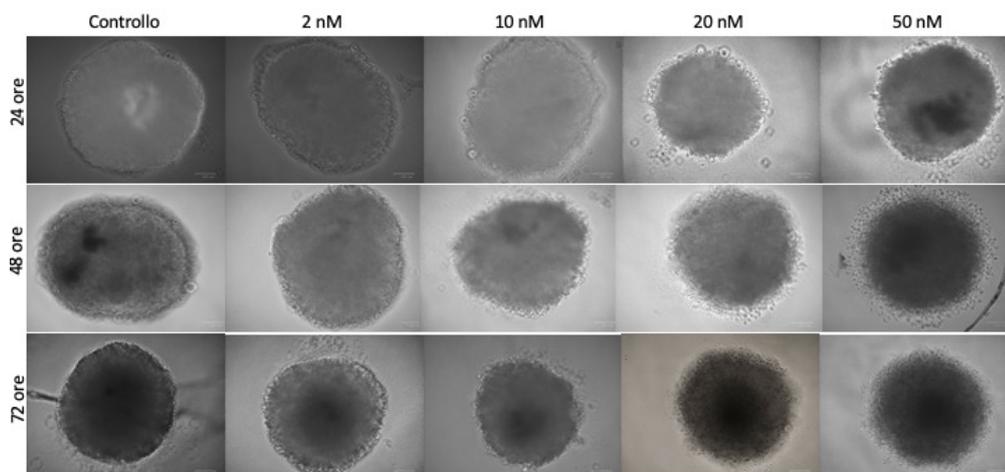


Figura 2.13: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate, cellule staminali tumorali e cellule della microglia (70:30). Scale bar 100 μ m

La tendenza delle cellule staminali tumorali a posizionarsi nella zona centrale dello sferoide è evidente nelle immagini in figura 2.14. Gli sferoidi rappresentati sono stati realizzati utilizzando delle cellule staminali tumorali marcate con la proteina fluorescente GFP, sono stati realizzati seminando le cellule all'interno di una piastra con il fondo ad U anti-adesiva. A quattro giorni dalla semina sono state scattate le immagini rappresentate in figura 2.13 con il microscopio a fluorescenza in cui risulta evidente la tendenza delle cellule staminali tumorali a posizionarsi spontaneamente nel core dello sferoide.

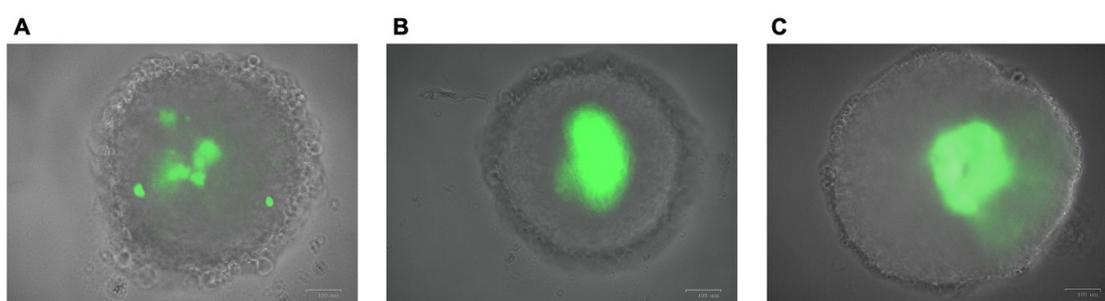


Figura 2.14: In figura sono rappresentate le immagini degli sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate, cellule staminali tumorali GFP+ (A) e dal mix i cellule staminali tumorali e cellule differenziate in co-coltura con cellule della microglia nei rapporti 50:50 (B) e 70:30 (C). Scale bar 100 μ m

2.2 Realizzazione del modello

Il modello è stato realizzato all'interno di un chip microfluidico costituito da un compartimento centrale, all'interno del quale si trovano i canali di perfusione e la graft chamber, tre inlet, uno per ogni canale di perfusione e uno per la graft chamber, e due outlet per i canali di perfusione.

All'interno degli inlet dei canali verranno seminate le cellule endoteliali cerebrali umane (HBEC-5i) affinché vadano a rivestire il canale creando la struttura del vaso. Secondo il protocollo fornito dai produttori del chip a circa quattro giorni dalla semina i canali saranno completamente rivestiti e sarà quindi possibile somministrare un mix di fattori di crescita (tabella 1.1) per indurre lo sviluppo di una rete capillare all'interno della graft chamber. Al termine dello sviluppo della rete capillare, verrà inserito lo sferoide tumorale all'interno della graft chamber per permetterne la vascolarizzazione.

Sono stati necessari diversi step di ottimizzazione per adattare il protocollo fornito al modello e alle cellule in esame, come descritto di seguito.

2.2.1 Cellularizzazione dei canali di perfusione

Per la realizzazione dei canali di perfusione, le cellule endoteliali devono essere seminate nei 2 inlet. Così facendo, è stato osservato che le cellule endoteliali cerebrali tendono a invadere immediatamente la graft chamber (fig. 2.15A), rendendo impossibile la realizzazione di un canale completamente rivestito da cellule.

Per questo motivo si è proceduto all'inserimento di 4 μ L di soluzione di collagene tipo I nell'inlet della graft chamber, in modo da consentire la formazione di una separazione fisica tra i canali di perfusione e la stessa graft chamber, una volta avvenuta la polimerizzazione del collagene a 37°C. In fig. 2.15B si nota infatti che la presenza del gel di collagene, permette di separare i canali dalla graft chamber, mantenendo le cellule endoteliali confinate nei canali stessi.

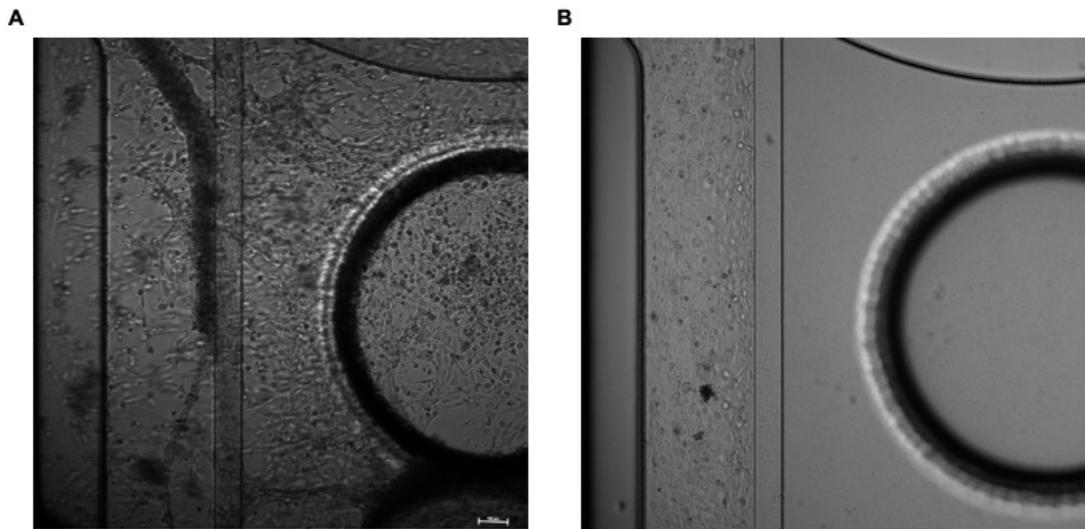


Figura 2.15: In figura è rappresentato il comportamento delle cellule endoteliali cerebrali inserite nei microcanali del chip in assenza (A) e in presenza (B) del gel di collagene all'interno della graft chamber. Le immagini sono state acquisite 24 ore dopo la semina. Scale bar 100 μ m

In figura 2.16 si osserva chiaramente che, nonostante la presenza del gel di collagene limiti la migrazione cellulare verso la graft chamber, la distribuzione delle cellule endoteliali cerebrali all'interno dei canali di perfusione, non è ottimale e l'adesione non risulta omogenea. E' evidente, già prima della somministrazione dei fattori di crescita, (fig. 2.16A) la presenza di macro-aggregati e di zone a bassa densità cellulare. In figura 2.16B è rappresentato lo stesso canale di perfusione dopo 7 giorni dalla somministrazione dei fattori di crescita: si osserva il totale distacco del rivestimento endoteliale dalla parete del canale.

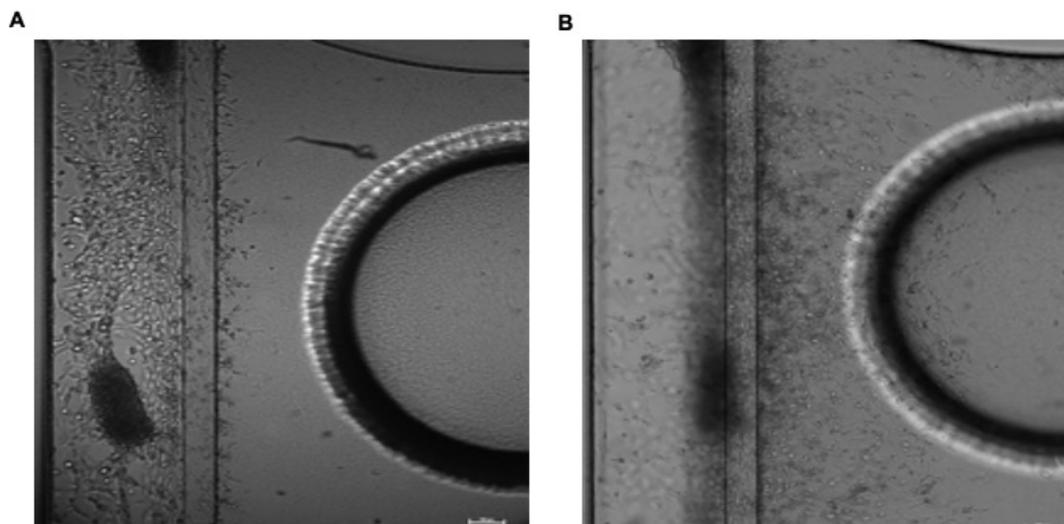


Figura 2.16: La figura mostra alcuni dei principali difetti riscontrati nei canali di perfusione rivestiti con cellule endoteliali. A) Presenza di macro-aggregati fluttuanti dovuti alla scarsa adesione delle cellule nel canale; B) Distacco del rivestimento endoteliale del canale (giorno 7). Scale bar 100 μm

Poiché le cellule endoteliali cerebrali vengono normalmente coltivate in flask rivestite con gelatina, per migliorarne l'adesione, l'assenza di questo rivestimento all'interno dei canali di perfusione potrebbe essere la causa della scarsa adesione osservata.

Per ovviare a questo inconveniente e garantire la corretta adesione cellulare nei canali di perfusione, il protocollo di semina è stato ottimizzato aggiungendo il medesimo rivestimento di gelatina anche all'interno del chip.

Sono quindi stati introdotti all'interno degli inlet dei canali di perfusione 2 μl di soluzione di gelatina in PBS (ATCC). Per permetterne la polimerizzazione la piastra è stata mantenuta per 20 minuti in incubatore a 37°C, al termine dei quali la gelatina in eccesso è stata rimossa.

L'immissione della gelatina all'interno dell'inlet del canale, anche se in volumi molto ridotti, ha però comportato la parziale o totale occlusione del canale stesso, rendendo quindi impossibile la semina.

Per evitare l'ostruzione dei canali ma ottenere una buona adesione cellulare, le cellule endoteliali sono state sospese in una soluzione composta da mezzo di coltura e gelatina (in rapporto 50:50) ed in seguito seminate all'interno degli inlet dei canali di perfusione.

I canali rivestiti in questo modo, presentano un rivestimento compatto di cellule endoteliali, che appare completo dopo circa 4 giorni di semina, come mostrato in figura 2.17 in cui sono riportate le immagini del canale di perfusione a 3 giorni (fig.2.17A) e a 5 giorni (fig.2.17B) dalla semina, , in figura 2.17C è rappresentato un ingrandimento della parete del canale di perfusione in cui si riesce ad osservare la distribuzione omogenea delle cellule endoteliali.

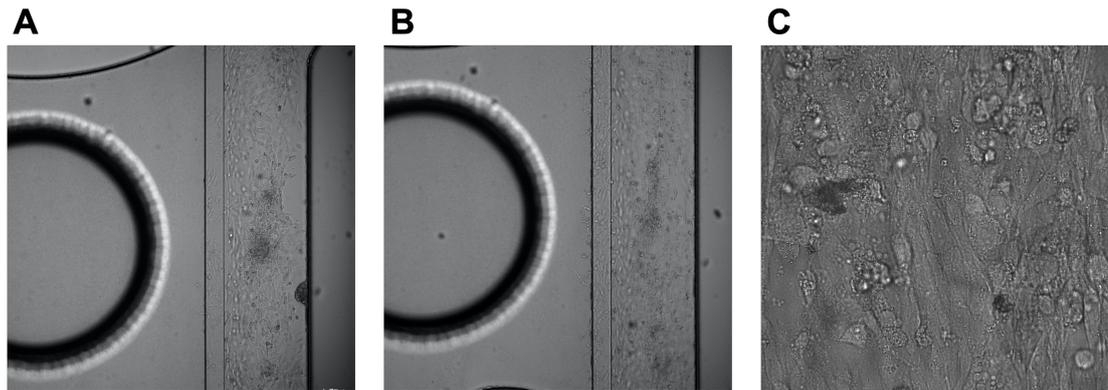


Figura 2.17: A) Immagine del canale di perfusione 3 giorni dopo la semina delle cellule endoteliali cerebrali. Scale bar 100 μm B) Immagine del canale di perfusione 5 giorni dopo la semina delle cellule endoteliali cerebrali. Scale bar 100 μm C) Ingrandimento della parete del canale di perfusione. Scale bar 20 μm

La struttura vascolare ottenuta è stata evidenziata grazie alla marcatura della proteina CD31 (fig. 2.18A), proteina di adesione caratteristica delle cellule endoteliali e delle piastrine [21], mentre la formazione di una struttura vascolare compatta è stata evidenziata mediante la marcatura della proteina ZO-1 (fig. 2.18B), proteina espressa a livello delle giunzioni occludenti [22]. Si può dedurre quindi che le pareti dei canali siano completamente sviluppate, presentino una struttura adeguata e che le cellule siano vitali. La presenza delle giunzioni occludenti, inoltre, rimanda alla struttura della barriera ematoencefalica, all'interno della quale le cellule endoteliali sono unite da questo particolare genere di occlusione per impedire il passaggio di sostanze dal torrente ematico all'interstizio [23].

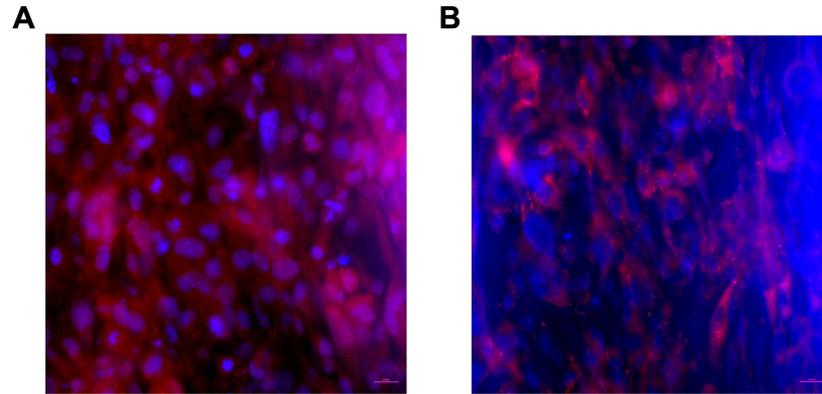


Figura 2.18: A) Ingrandimento del canale di perfusione in cui le cellule endoteliali sono state marcate con l'anticorpo Anti-CD31 (in rosso) e con il DAPI (in blu). Scale bar 20 μm . B) Ingrandimento del canale di perfusione in cui le cellule endoteliali sono state marcate con l'anticorpo Anti-ZO1 (in rosso) e con il DAPI (in blu) Scale bar 20 μm

Lo sviluppo dei canali di perfusione ha richiesto 4 giorni, al termine dei quali sono stati somministrati i fattori di crescita al fine di indurre la formazione della rete vascolare all'interno della graft chamber. I fattori di crescita somministrati sono espressi nel dettaglio in tabella 1.1.

La presenza della gelatina non ha ostacolato lo sviluppo della rete capillare come si osserva in figura 2.19 in cui viene riportato lo stato dello sviluppo della rete capillare prima dell'aggiunta dei fattori di crescita (fig. 2.19A), il giorno successivo (fig. 2.19B) e a 5 giorni dalla somministrazione (fig. 2.19C).

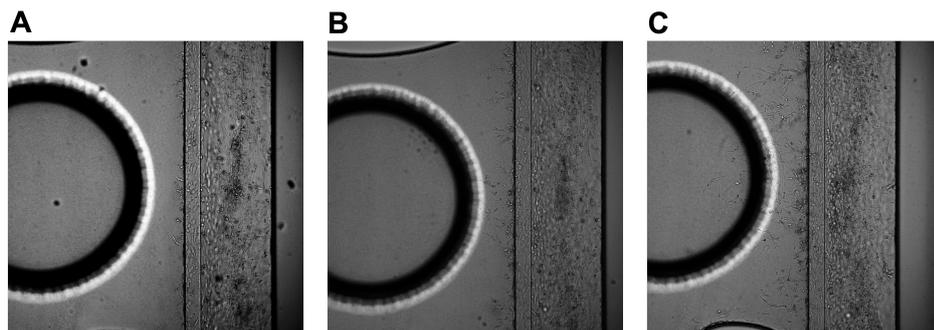


Figura 2.19: Sviluppo della rete capillare in seguito alla somministrazione dei fattori di crescita. In figura sono rappresentati i capillari prima della somministrazione dei fattori di crescita (A), al giorno 1 (B) e al giorno 5 (C). Scale bar 100 μm

Come si può notare, la somministrazione del cocktail di fattori di crescita stimola la formazione di nuovi micro-canali che, dal canale principale, si dipartono verso la graft chamber. In figura 2.20 è rappresentato un dettaglio del canale di perfusione a 7 giorni dalla somministrazione dei fattori di crescita. Si osserva che la presenza del rivestimento non ha limitato la formazione della rete capillare (fig. 2.20A) che si sta sviluppando all'interno della graft chamber e ha garantito una corretta adesione delle cellule endoteliali alle pareti del canale di perfusione (fig. 2.20B)

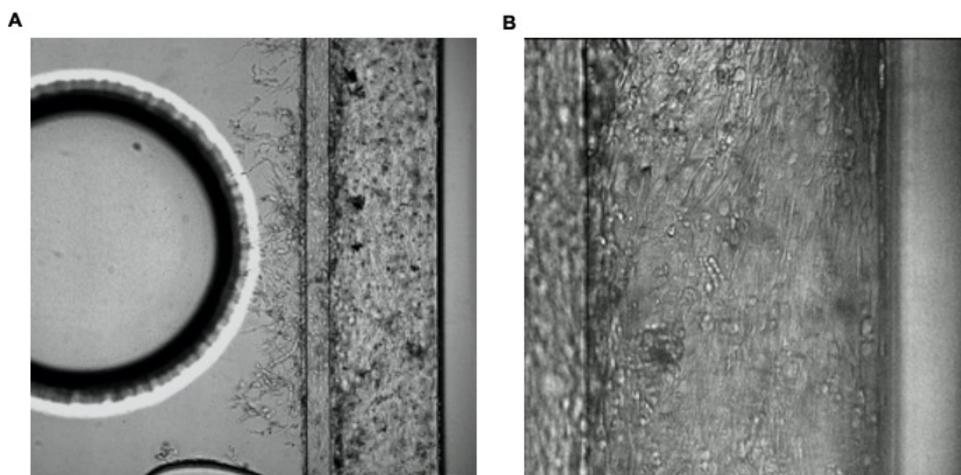


Figura 2.20: A) Sviluppo dei vasi in seguito alla somministrazione dei fattori di crescita. Scale bar 100 μm B) Ingrandimento del canale di perfusione su cui è stato effettuato il rivestimento con la gelatina. Scale bar 50 μm

L'espressione delle proteine CD31 e Zo-1 è stata verificata anche nei canali neo-formati (fig. 2.21), allo scopo di evidenziarne meglio la morfologia e verificare la formazione di tight junctions, caratteristiche della vascolatura cerebrale [24]. Nelle immagini in figura 2.21)A è stata marcata la proteina CD31: si osserva che a 7 giorni dalla somministrazione dei fattori di crescita è presente una rete capillare complessa e altamente ramificata. La presenza delle giunzioni occludenti, evidenziata dallo staining in figura 2.21)B, rimanda alla struttura dell'endotelio cerebrale umano.

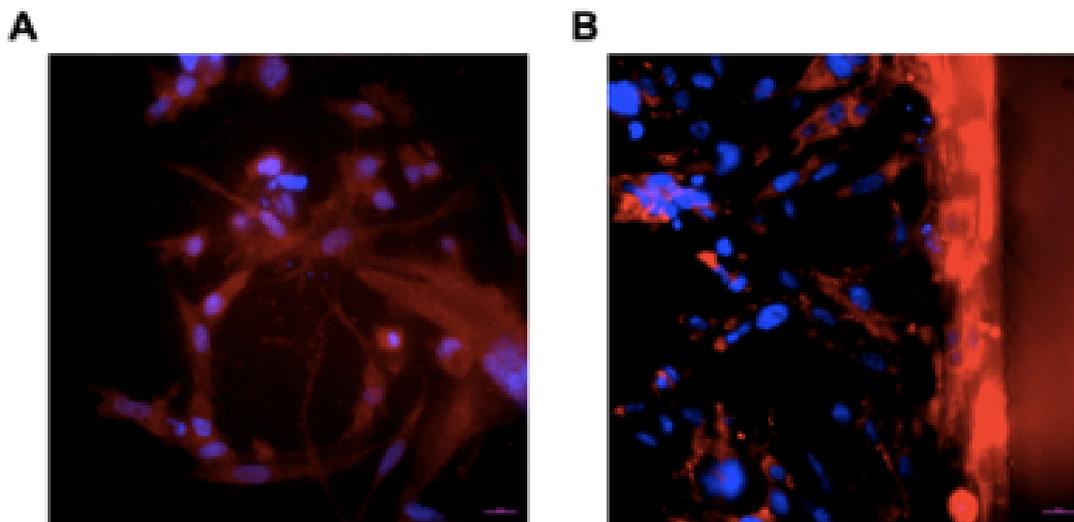


Figura 2.21: A) Ingrandimento della rete capillare su cui è stato effettuato lo staining con l'anticorpo Anti-CD31 (in rosso) e con il DAPI (in blu). Scale bar 20 μm B Ingrandimento della rete capillare su cui è stato effettuato lo staining con l'anticorpo Anti-ZO1 (in rosso) e con il DAPI (in blu). Scale bar 20 μm

2.2.2 Test di permeabilità vascolare

Una volta ottenuta una rete vascolare con le sue diramazioni, avente caratteristiche promettenti (ovvero espressione delle proteine CD31 e ZO-1), si è proceduto alla verifica della permeabilità dei vasi così ottenuti. In particolare, sono state usate delle nanoparticelle marcate con il fluoroforo rodamina, che sono state iniettate all'interno dei canali di perfusione vascolarizzati. Tali particelle sono state selezionate in quanto test precedenti, effettuati presso il Houston Methodist Research Institute visualizzando in tempo reale i vasi sanguigni cerebrali di topi in microscopia intravital, ne hanno dimostrato l'incapacità di passare attraverso la barriera endoteliale cerebrale. Infatti, tali particelle una volta iniettate per via endovenosa, permangono nel micro circolo cerebrale senza accumularsi a livello dell'endotelio vascolare e senza mostrare segni di accumulo nel parenchima cerebrale.

Le NPs sono state ottenute con il metodo della nanoprecipitazione e presentano una superficie lipidica, la cui composizione può essere variata inserendo lipidi marcati con fluorofori. Nel caso specifico, è stato utilizzato un lipide marcato con il fluoroforo rodamina.

Le nanoparticelle così ottenute presentano un diametro idrodinamico di 150 nm e un potenziale zeta negativo, come riassunto in tabella 2.1.

	NPs con BTZ	NPs vuote
Diametro idrodinamico medio [nm]	152±19	117±15
Indice di Polidispersità	0.13	0.17
Potenziale Z [mV]	-51±1.5	-63±1.3

Tabella 2.1: Risultati ottenuti dalle analisi col DLS

Si osserva che con l'aggiunta del farmaco all'interno della composizione delle NPs si verifica un aumento di diametro idrodinamico di circa 35 nm. Il potenziale Z invece risulta meno negativo nelle NPs contenenti il farmaco (-51±1.5 e -63±1.3 rispettivamente con e senza il BTZ), variazione dovuta alla carica positiva del BTZ. Le nanoparticelle sono in grado di caricare e rilasciare nel tempo il farmaco BTZ, come mostrato dal profilo di rilascio in figura 2.22. Si osserva un'iniziale burst release che si arresta al secondo time point (24h) dopo di che si verifica un rilascio di farmaco graduale, molto ridotto ma continuo fino al settimo giorno. Le NPs, dunque, mantenute in acqua distillata a temperatura fisiologica, continuano a rilasciare il farmaco fino a 7 giorni dalla preparazione, anche se in quantitativi sempre più ridotti.

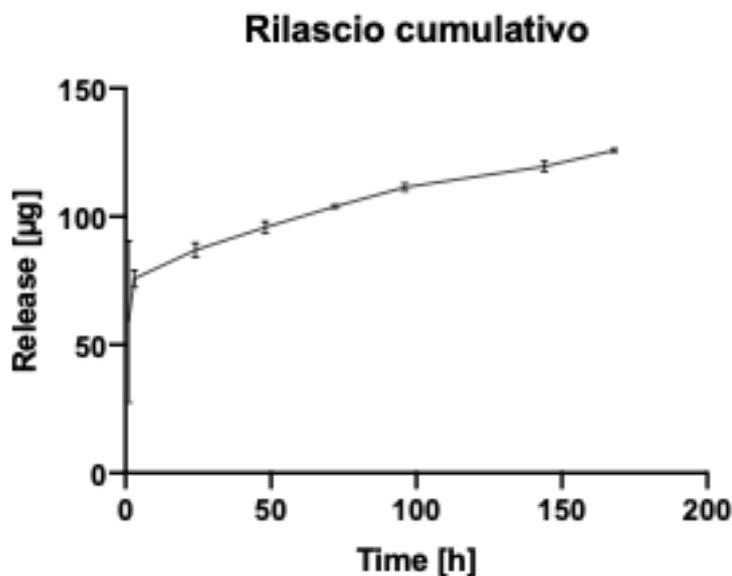


Figura 2.22: Nel grafico è rappresentato l'andamento del rilascio cumulativo nei 7 giorni successivi alla preparazione della NPs

I test effettuati somministrando le nanoparticelle fluorescenti all'interno del canale hanno confermato l'integrità della parete del canale di perfusione. Le cellule hanno formato una struttura compatta, priva di fenestrature. Come si osserva in

figura 2.23 le nanoparticelle si muovono all'interno del canale senza poter extravasare e migrare verso la graft chamber.

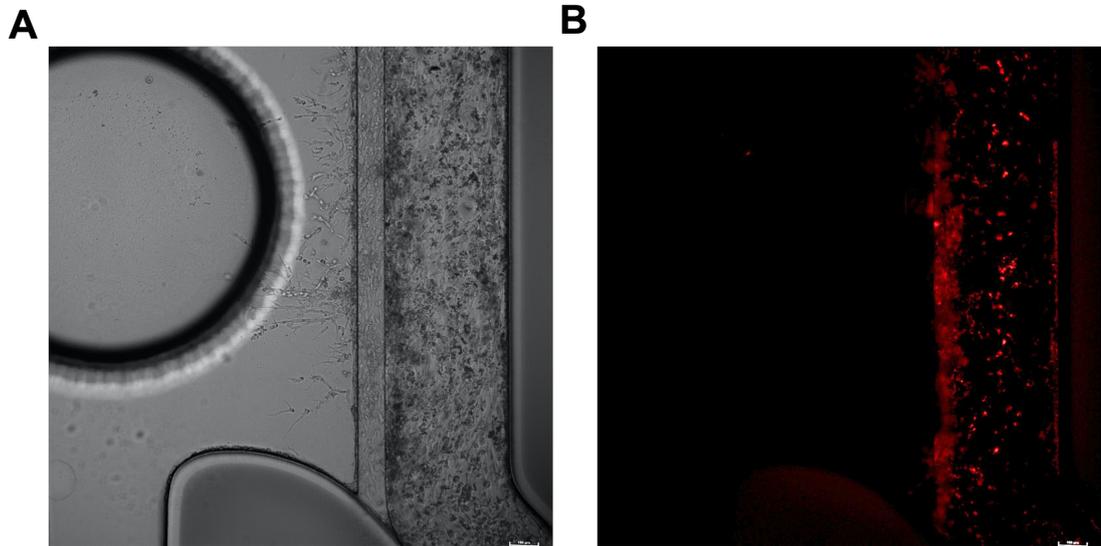


Figura 2.23: A) Canale di perfusione a 7 giorni dalla somministrazione dei fattori di crescita. Scale bar 100 μm B) immagine in fluorescenza del canale di perfusione al cui interno sono state introdotte nanoparticelle funzionalizzate con la rodamina. Scale bar 100 μm

2.2.3 Introduzione dello sferoide tumorale

Lo sviluppo della rete capillare ha richiesto 5 giorni dalla somministrazione dei fattori di crescita al termine dei quali sono stati introdotti gli sferoidi tumorali. In particolare, sono stati impiegati sferoidi costituiti dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule staminali tumorali (in rapporto 90:10).

In figura 2.24 si osserva l'intero chip al cui interno è stato introdotto uno sferoide costituito da cellule staminali tumorali e cellule tumorali differenziate, seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice del chip. L'immagine è stata scattata a 1 ora dall'introduzione dello sferoide.

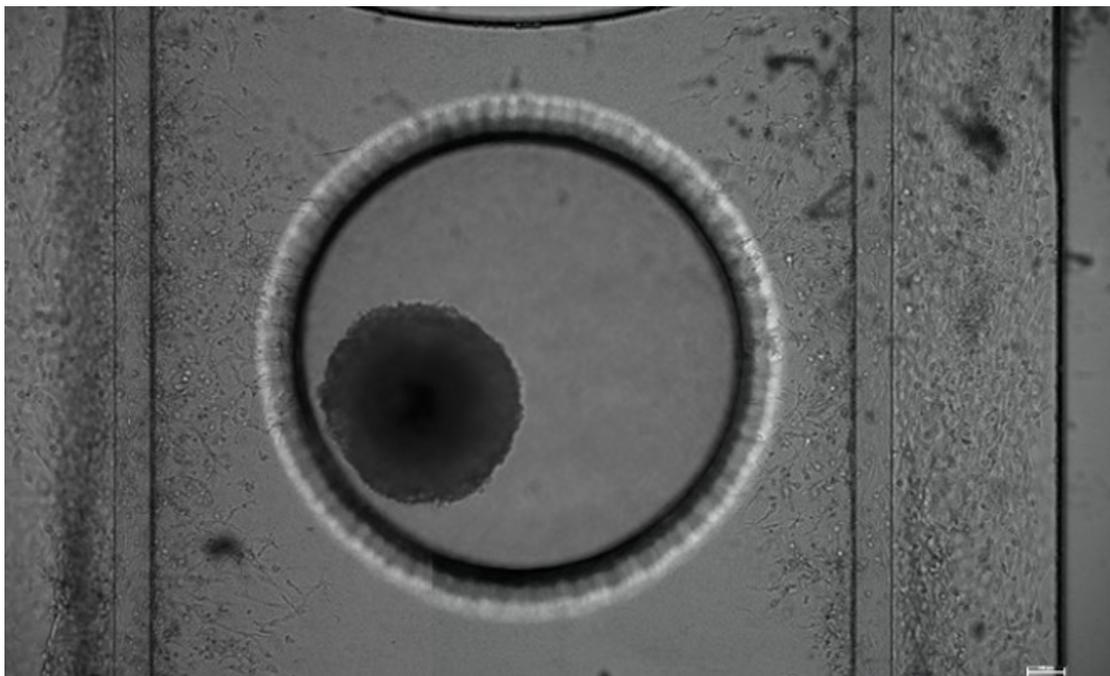


Figura 2.24: Nell'immagine è rappresentato il chip all'interno del quale è stato inserito lo sferoide tumorale 1 ora dopo il posizionamento. Scale bar 100 μm

È stato osservato però, che lo sferoide subisce, nell'arco di 24 ore, una totale perdita di struttura.

In figura 2.25 è rappresentato lo stesso chip mostrato in figura 2.24 dopo 24 ore dal posizionamento dello sferoide. È evidente che lo sferoide tende a rompersi nel momento in cui entra in contatto con il gel di collagene presente all'interno della graft chamber perdendo la struttura tridimensionale.

Si osserva nella zona centrale la presenza di un aggregato a maggiore densità cellulare costituito dalle cellule staminali tumorali mentre le cellule tumorali differenziate hanno completamente invaso la graft chamber.

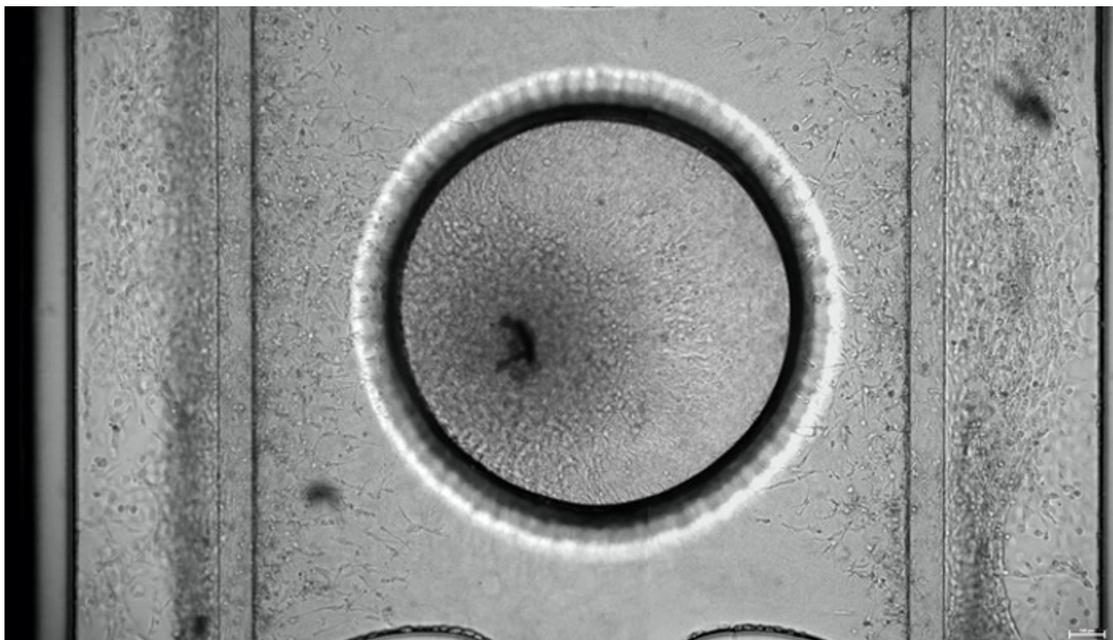


Figura 2.25: Nell'immagine è rappresentato il chip all'interno del quale è stato inserito lo sferoide tumorale 24 ore dopo il posizionamento. Scale bar 100 μm

Saggio di migrazione cellulare

Per limitare la tendenza dello sferoide a perdere la struttura tridimensionale quando entra in contatto con il gel di collagene presente all'interno della graft chamber è stata indagata la capacità del gel VitroGel® 3D di mantenere l'integrità dello sferoide.

Il saggio è stato effettuato andando a posizionare gli sferoidi tumorali all'interno di una multi-well da 96 pozzetti all'interno dei quali era stato effettuato un rivestimento con il VitroGel® 3D.

Le immagini in figura 2.26 rappresentano gli sferoidi, costituiti dalla coltura singola di cellule tumorali differenziate e dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e di cellule della microglia in diversi rapporti (50:50 e 70:30). Si osserva come fino a 7 giorni dall'introduzione dello sferoide all'interno del gel questo rimanga perfettamente integro, fatta eccezione per lo sferoide costituito dalla co-coltura di cellule tumorali differenziate e cellule della microglia in rapporto 50/50, che al settimo giorno presenta una certo quantitativo di cellule che invadono l'ambiente circostante lo sferoide.

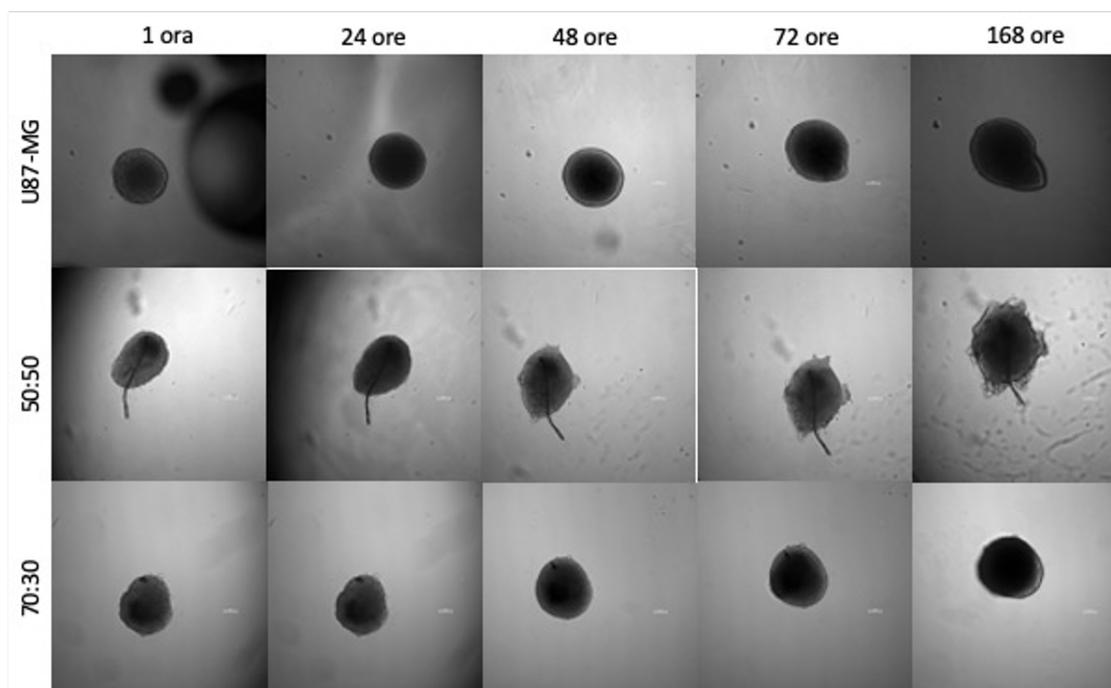


Figura 2.26: In figura sono mostrati gli sferoidi tumorali coltivati all'interno del VitroGel® 3D a diversi time-point. Scale bar 100 μ m

Alla luce dei risultati ottenuti il VitroGel® 3D è stato considerato adeguato come supporto per lo sferoide tumorale all'interno del chip.

Il VitroGel® 3D è stato diluito in rapporto 1:5 v/v con la sua soluzione di diluizione e ne sono stati introdotti 40 μ l all'interno della graft chamber. Lo sferoide tumorale è stato prelevato con 10 μ l di mezzo e posizionato all'interno del gel, come mostrato in figura 2.27.

È stato osservato che, con il supporto del VitroGel® 3D, lo sferoide riesce a mantenere un certo livello di integrità all'interno della graft chamber, come si osserva in figura 2.28 in cui è rappresentato lo sferoide tumorale a 24 ore dal posizionamento all'interno della graft chamber. Rispetto alle immagini mostrate nelle figure 2.24 e 2.25, in cui non era presente il VitroGel® 3D all'interno della graft chamber, lo sferoide sembra riuscire a mantenere la sua struttura tridimensionale grazie all'azione di supporto del gel.

Inoltre sembra che la presenza del VitroGel® 3D non ostacoli lo sviluppo della rete vascolare all'interno della graft chamber, come mostrato in figura 2.28A e B.

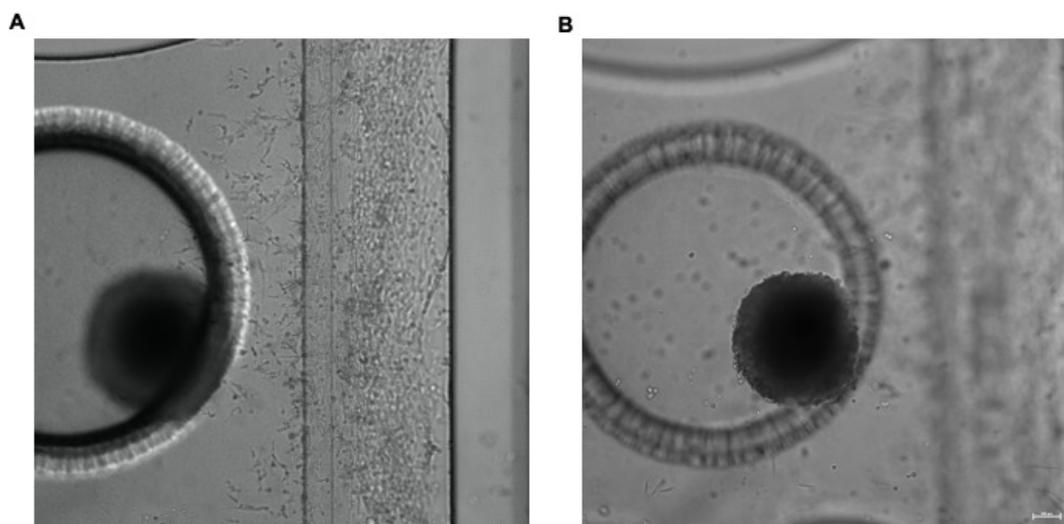


Figura 2.27: In figura viene rappresentato il chip all'interno del quale è stato introdotto il VitroGel® 3D. A 1 ora dal posizionamento lo sferoide mantiene la struttura tridimensionale. Scale bar 100 μm

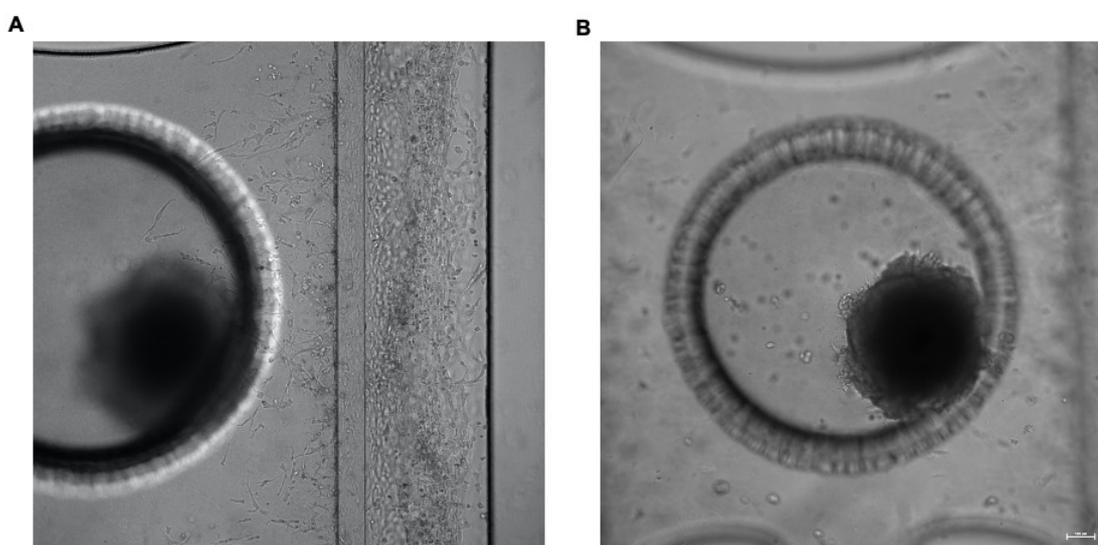


Figura 2.28: In figura viene rappresentato il chip all'interno del quale è stato introdotto il VitroGel® 3D. A 1 ora dal posizionamento lo sferoide mantiene la struttura tridimensionale. Scale bar 100 μm

Capitolo 3

Conclusioni

Il glioblastoma multiforme (GBM) è la neoplasia più aggressiva e più frequente fra quelle che traggono origine dal sistema nervoso cerebrale. La sua incidenza (cioè il numero di nuovi casi all'anno) media in Italia è di 8 casi ogni 100.000 abitanti e rappresenta il 54% di tutti i gliomi diagnosticati con una sopravvivenza mediana di circa 18 mesi.

L'elevato grado di eterogeneità, a livello intra- e inter-tumorale, caratteristico del glioblastoma multiforme rende estremamente complesso lo sviluppo di modelli rappresentativi e dunque la validazione di terapie efficaci.

Una delle principali caratteristiche del glioblastoma multiforme, aspetto che lo contraddistingue dagli altri gliomi di grado inferiore, è l'elevato grado di proliferazione microvascolare ma, ad oggi, non sono presenti in letteratura, modelli tumorali che tengano conto di questo fattore.

Nell'ambito di questo progetto di tesi è stata posta l'attenzione sullo sviluppo di un modello di glioblastoma che presentasse una rete vascolare in grado di replicare ex vivo il ruolo dell'endotelio cerebrale sia nello sviluppo tumorale sia nelle strategie di trattamento.

È stato utilizzato il chip OrganoPlate®Graft, realizzato da MIMETAS, come supporto per lo sviluppo del modello vascolarizzato.

A partire dai protocolli forniti dalla casa produttrice del chip sono stati implementati diversi processi di ottimizzazione al fine aumentare la consistenza del modello realizzato. L'utilizzo esclusivo di cellule umane ha permesso di ridurre la variabilità caratteristica dei modelli animali e degli xenotrapianti, molto utilizzati nei test preclinici, che spesso porta al fallimento delle sperimentazioni. In particolare, a livello di questo progetto di tesi sono state utilizzate cellule endoteliali cerebrali, cellule del sistema immunitario e cellule tumorali, staminali e differenziate. È

evidente che, allo stato attuale, il modello non è in grado di rispecchiare la complessità che caratterizza il glioblastoma multiforme ma, pur trattandosi di uno studio preliminare, sono stati ottenuti risultati significativi.

È stata realizzata una primitiva rete vascolare all'interno del chip ed è stato caratterizzato un modello tumorale tridimensionale in grado di rispecchiare, sotto determinati aspetti, il comportamento del tumore umano.

Nonostante sia necessario aumentare il grado di complessità del modello andando ad aggiungere nuove popolazioni cellulari, come neuroni o astrociti, al fine di avvicinarsi maggiormente alla condizione osservabile in vivo, i risultati ottenuti sono promettenti: la rete vascolare riporta le principali caratteristiche della microvascolatura cerebrale. Sono stati effettuati dei test preliminari con nanoparticelle fluorescenti per valutare la capacità della rete vascolare di bloccare il passaggio di sostanze dal flusso ematico verso il tumore ed è stato osservato che i vasi neoformati riescono a schermare il passaggio delle nanoparticelle, analogamente a quanto osservabile in vivo. Gli sferoidi tumorali, introdotti all'interno del dispositivo microfluidico descritto, rappresentano un ottimo strumento per studiare il comportamento del glioblastoma multiforme all'interno del microambiente cerebrale umano e, di conseguenza, definire nuove strategie terapeutiche.

Una volta caratterizzato il modello si presuppone di utilizzarlo per effettuare degli studi incentrati sulla reazione del modello alla terapia con BTZ somministrato all'interno di nanoparticelle polimeriche, precedentemente caratterizzate. In questo ambito la realizzazione di una rete vascolare in grado di limitare il passaggio di sostanze alla nanoscala verso l'interstizio e quindi verso il tumore è fondamentale in quanto riflette il comportamento osservabile in vivo e dunque permette di realizzare delle soluzioni terapeutiche effettivamente efficaci.

Bibliografia

- [1] *Trattato di neuropatologia*. ita. Torino: Contatto Archimedita, 2006 (cit. a p. 2).
- [2] Fatemeh Pourgholi, Jadidi-Niaragh Farhad, Hossein Samadi Kafil, Mehdi Yousefi et al. «Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma». In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77 (2016), pp. 98–107 (cit. a p. 4).
- [3] Neil Grech, Theresia Dalli, Sean Mizzi, Lara Meilak, Neville Calleja e Antoine Zrinzo. «Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population». In: *Cureus* 12.5 (2020) (cit. a p. 5).
- [4] Edouard Alphan  ry. «Nano-therapies for glioblastoma treatment». In: *Cancers* 12.1 (2020), p. 242 (cit. alle pp. 6, 7).
- [5] Irina Naletova, Lorena Maria Cucci, Floriana D'Angeli, Carmelina Daniela Anfuso, Antonio Magri, Diego La Mendola, Gabriella Lupo e Cristina Satriano. «A tunable nanoplatform of nanogold functionalised with angiogenin peptides for anti-angiogenic therapy of brain tumours». In: *Cancers* 11.9 (2019), p. 1322 (cit. a p. 7).
- [6] Edward D Zanders, Fredrik Svensson e David S Bailey. «Therapy for glioblastoma: is it working?». In: *Drug discovery today* 24.5 (2019), pp. 1193–1201 (cit. a p. 8).
- [7] Roberta Azzarelli. «Organoid Models of Glioblastoma to Study Brain Tumor Stem Cells». In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (2020), p. 220 (cit. alle pp. 8, 10).
- [8] Chaocai Zhang, Mingzhu Jin, Jiannong Zhao, Juxiang Chen e Weilin Jin. «Organoid models of glioblastoma: advances, applications and challenges». In: *American Journal of Cancer Research* 10.8 (2020), p. 2242 (cit. a p. 9).
- [9] Rossella Galli et al. «Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma». In: *Cancer research* 64.19 (2004), pp. 7011–7021 (cit. a p. 9).

- [10] Christopher G Hubert et al. «A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found in vivo». In: *Cancer research* 76.8 (2016), pp. 2465–2477 (cit. a p. 9).
- [11] Fadi Jacob et al. «A patient-derived glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter-and intra-tumoral heterogeneity». In: *Cell* 180.1 (2020), pp. 188–204 (cit. alle pp. 11, 12).
- [12] Hemamylammal Sivakumar, Mahesh Devarasetty, David E Kram, Roy E Strowd e Aleksander Skardal. «Multi-Cell Type Glioblastoma Tumor Spheroids for Evaluating Sub-Population-Specific Drug Response». In: *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (2020), p. 1096 (cit. a p. 12).
- [13] Shan Bian, Marko Repic, Zhenming Guo, Anoop Kavirayani, Thomas Burkard, Joshua A Bagley, Christian Krauditsch e Jürgen A Knoblich. «Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation». In: *Nature methods* 15 (2018), pp. 631–639 (cit. alle pp. 13, 14).
- [14] Junko Ogawa, Gerald M Pao, Maxim N Shokhirev e Inder M Verma. «Glioblastoma model using human cerebral organoids». In: *Cell reports* 23.4 (2018), pp. 1220–1229 (cit. alle pp. 14, 15).
- [15] Amanda Linkous et al. «Modeling patient-derived glioblastoma with cerebral organoids». In: *Cell reports* 26.12 (2019), pp. 3203–3211 (cit. alle pp. 16, 17).
- [16] Metin Akay, John Hite, Naze Gul Avci, Yantao Fan, Yasemin Akay, Guangrong Lu e Jay-Jiguang Zhu. «Drug screening of human GBM spheroids in brain cancer chip». In: *Scientific reports* 8.1 (2018), pp. 1–9 (cit. alle pp. 18, 19).
- [17] Hee-Gyeong Yi et al. «A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy». In: *Nature biomedical engineering* 3.7 (2019), pp. 509–519 (cit. a p. 20).
- [18] Jan Styczynski, Dorota Olszewska-Slonina, Beata Kolodziej, Malgorzata Napieraj e Mariusz Wysocki. «Activity of bortezomib in glioblastoma». In: *Anticancer research* 26.6B (2006), pp. 4499–4503 (cit. a p. 27).
- [19] Xudong Zhang, Weiming Li, Chunlan Wang, Xiangyang Leng, Shulin Lian, Jingbin Feng, Jinliang Li e Hailiang Wang. «Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by proteasome inhibitor bortezomib in human glioblastoma U87 and U251 cells». In: *Molecular and cellular biochemistry* 385.1 (2014), pp. 265–275 (cit. a p. 27).
- [20] Justin D Lathia, Stephen C Mack, Erin E Mulkearns-Hubert, Claudia LL Valentim e Jeremy N Rich. «Cancer stem cells in glioblastoma». In: *Genes & development* 29.12 (2015), pp. 1203–1217 (cit. a p. 42).

- [21] Li Liu e Guo-Ping Shi. *CD31: beyond a marker for endothelial cells*. 2012 (cit. a p. 50).
- [22] Hans-Christian Bauer, ANDREAS TRAWEGGER e Hannelore Bauer. «Proteins of the tight junction in the blood-brain barrier». In: *Blood-spinal cord and brain barriers in health and disease*. Elsevier, 2004, pp. 1–10 (cit. a p. 50).
- [23] Anny-Claude Luissint, Cédric Artus, Fabienne Glacial, Kayathiri Ganeshamoorthy e Pierre-Olivier Couraud. «Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation». In: *Fluids and Barriers of the CNS* 9.1 (2012), pp. 1–12 (cit. a p. 50).
- [24] Patricia M Watson, James M Anderson, Christina M Vanltallie e Susan R Doctrow. «The tight-junction-specific protein ZO-1 is a component of the human and rat blood-brain barriers». In: *Neuroscience letters* 129.1 (1991), pp. 6–10 (cit. a p. 52).