



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE APPLICATE BIOTECNOLOGICHE**

Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale  
Curriculum Medicina Sperimentale, clinica ed endocrinologia  
XXXV ciclo

Titolo della tesi

**Analisi comparativa dell'effetto degli inibitori delle tirosin-chinasi tra  
colture di cellule tumorali 2D e 3D**

SSD MED04

Dottoranda  
Samantha Sabetta

Coordinatore del corso  
Prof. Mariagrazia Perilli

Tutor  
Prof. Adriano Angelucci

A.A. 2021/2022

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	
1.1 La Tirosin-chinasi Src.....	pag. 4
1.1.1 La struttura della Tirosin-chinasi Src .....	pag. 7
1.2 La regolazione dell'attività di Src.....	pag 10
1.2.1 Regolazione di Src da parte di Csk e Chk.....	pag 12
1.2.2 Regolazione dell'attività di Src da parte delle fosfatasi... ..	pag 12
1.3 Il ruolo di Src nella trasduzione del segnale.....	pag 14
1.4 Src e la progressione tumorale.....	pag 16
1.5 Inibitori di Src.....	pag 16
1.6 Modelli cellulari 2D.....	pag 19
1.7 Sferoidi 3D... ..	pag 20
1.7.1 Tecnica "hanging drop".....	pag 22
1.7.2 Altre tecniche di coltura cellulare 3D.....	pag 23
1.8 Matrice per colture cellulari 3D.....	pag 24
1.9 Il bioprinting 3D... ..	pag 26
1.9.1 Elementi chiave del bioprinting 3D.....	pag 27
1.9.2 Bioprinting basato sull'estrusione .....	pag 30
1.9.3 Altre modalità di bioprinting .....	pag 32
<b>2. SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>pag 34</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>pag 35</b>
3.1 Linee cellulari.....	pag 35
3.2 Preparazione dell'idrogel e bioprinting .....	pag 35
3.3 Analisi della vitalità cellulare e dell'IC50.....	pag 36
3.4 Western Blot.....	pag 37
3.5 Formazione sferoidi.....	pag 38
3.6 Analisi della vitalità degli sferoidi.....	pag 38
3.7 Saggio di migrazione cellulare .....	pag 39
3.8 Saggio di disseminazione degli sferoidi.....	pag 40

<b>4.   RISULTATI</b> .....	pag 41
4.1 Crescita delle cellule tumorali nell'impalcatura biostampata.....	pag 41
4.2 Effetto antiproliferativo di dasatinib, si306 e PD1 nei modelli cellulari 2D e 3D.....	pag 43
4.3 Valutazione dell'attivazione di Src.....	pag 47
4.4 Inibizione della migrazione cellulare da parte di dasatinib, si306 e PD1.....	pag 50
4.5 Inibizione della disseminazione cellulare negli sferoidi.....	pag 53
<b>5.   DISCUSSIONE</b> .....	pag 56
<b>6.   BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag 60

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The tumor microenvironment is known to be complex, both in its content and dynamic nature, which is difficult to study using two-dimensional (2D) cell culture models; in contrast, 3D cell models are able to confer new predictive relevance to in vitro tumor models. In particular, the 3D tumor spheroid model is believed to better resemble the complexity of tumor associated with drug resistance than the 2D model. Recent advances in 3D printing techniques and suitable biomaterials have offered new promise in the development of 3D tissue cultures. 3D bioprinting is a new approach that offers high reproducibility and precise control of 3D printed structures. The substrate used for printing is the combination of sodium alginate and gelatin that provides an excellent hydrogel.

**MATERIALS AND METHODS:** This Ph.D. project aims to evaluate treatment sensitivity to Src inhibitors in two different tumor lines, DU145 prostate cancer cells and U87 glioblastoma cells, cultured in a 3D spheroid model and a 3D bioprinting model. The compounds in question are dasatinib and two pyrazole [3,4-d] pyrimidine inhibitors: si306 and PD1-si306 (pro-drug of si306).

**RESULTS:** DU145 and U87 were able to proliferate in three-dimensional bioprinted alginate/gelatin structures for two weeks, forming spheroidal aggregates. Treatment with dasatinib showed that cells cultured with the 3D bioprinting model were more resistant to drug toxicity, comparable to the behavior observed in the 3D spheroid model, than the corresponding cells cultured in 2D. In contrast, spheroids treated with si306 and PD1 showed less resistance, compared with the bioprinting model. Analysis of the cells from the 3D bioprinting structures allowed us to hypothesize that the resistance to these inhibitors, depends on poor drug penetration, a phenomenon also reported in spheroids in some cases.

**CONCLUSIONS:** The 3D bioprinted model utilizing alginate/gelatin hydrogel was demonstrated to be a suitable model in drug screening when spheroid growth is required, offering advantages in feasibility and reproducibility, compared to the classical 3D spheroids model

## INTRODUZIONE

### 1.1 La Tirosin-chinasi Src

Le tirosin-chinasi sono una famiglia di enzimi ad attività chinasi capaci, in risposta a stimoli esterni ed interni alla cellula, di fosforilare residui di tirosina in proteine bersaglio, usando ATP; questa modifica covalente post-traduzionale è essenziale per la comunicazione cellulare ed il mantenimento dell'omeostasi cellulare. In condizioni normali, l'attività delle tirosin-chinasi è strettamente regolata, in maniera da mediare diversi processi biologici, quali la crescita, il differenziamento cellulare, il metabolismo, la migrazione e l'apoptosi [1]. Ma l'attivazione costitutiva conferisce a questi enzimi uno status di oncoproteine, che indirizza la cellula verso una progressione neoplastica.

Src è una proteina di 60 kDa e rappresenta il membro più ampiamente studiato delle tirosin chinasi della famiglia Src (SFK), essendo frequentemente sovraespresso in molti tumori. La tirosin-chinasi Src è stata oggetto di indagini per decenni. Questi studi derivano dal lavoro sul virus del sarcoma di Rous, un virus del tumore del pollo. Tale virus venne scoperto, nel 1911, da Francis Peyton Rous, il quale riuscì a purificare una sostanza dai polli che in seguito si dimostrò essere appunto un virus che causa il sarcoma (virus del sarcoma di Rous) [2]. L'oncogene responsabile è stato chiamato v-Src [3,4]. Nel 1966 a Rous è stato conferito il premio Nobel per la sua rivoluzionaria scoperta che un virus può causare il cancro [5]. Nel 1976, Bishop e Varmus scoprirono un gene correlato ai polli, che mostrava una sorprendente somiglianza con v-Src. Questa controparte cellulare normale è nota come c-Src o Src (l'omologo cellulare nell'uomo, nei polli e in altri animali), codificata da un gene fisiologico ed è stato il primo protooncogene ad essere identificato. La sua scoperta ha portato al premio Nobel per la medicina nel 1989 [4]. Src è stato anche il primo prodotto genico scoperto ad avere un'attività intrinseca della proteina tirosina chinasi [6]. L'attività incontrollabile di v-Src è attribuita alla mancanza della coda regolatrice C-terminale, nonché a diverse mutazioni puntiformi nella sua sequenza amminoacidica. Il gene Src umano codifica per una proteina di 536 amminoacidi, invece, il gene Src del pollo codifica per una proteina di 533 residui. I tre

amminoacidi aggiuntivi nell'uomo sono inseriti vicino alla regione N-terminale. L'oncogene virale del pollo contiene 7 amminoacidi in meno rispetto al suo protoncogene fisiologico.

Le SFK sono una grande classe di chinasi non recettoriale che controllano più vie di segnalazione nelle cellule animali, la cui attivazione è necessaria per il segnale mitogenico di molti fattori di crescita, ma anche per l'acquisizione del fenotipo migratorio e invasivo. Infatti, è stato dimostrato che l'attivazione oncogenica degli SFK gioca un ruolo importante nei tumori solidi; promuovendo la crescita del tumore e la formazione di metastasi ed è per questo motivo che rappresentano la classe più rappresentativa di proteine mirate nella terapia antitumorale [7]. Le tirosin-chinasi possono essere suddivise in due gruppi: tirosin-chinasi recettoriali (RTK) e tirosin-chinasi non recettoriali (nRTK). Le RTK sono recettori di membrana con attività tirosin-chinasica, infatti sono costituiti da un dominio extracellulare per l'interazione con il ligando, una sequenza trans-membrana ed un dominio chinamico intracellulare. L'interazione del ligando con la porzione extracellulare del recettore ne determina la dimerizzazione. Tale evento promuove l'attivazione della chinasi mediante auto-fosforilazione del dominio catalitico permettendo la trasduzione del segnale all'interno della cellula. Le nRTK, invece, sono molecole trasduttrici del segnale prive della porzione extracellulare e trans-membrana e possono essere legate direttamente o indirettamente ai recettori tirosin-chinasici, recettori accoppiati a proteine G, recettori steroidei, trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione e molecole coinvolte nell'adesione e migrazione cellulare. Queste interazioni portano a una vasta gamma di funzioni biologiche, tra cui proliferazione, crescita cellulare, differenziamento, motilità, migrazione, angiogenesi e sopravvivenza cellulare.

Le nRTK rappresentano una grande famiglia di enzimi citosolici. Tale famiglia è composta da 11 membri altamente omologhi: Src (Rous sarcome) Blk (B-lymphoid tyrosine kinase), Fgr (gardner-rasheed feline sarcoma), Fyn (protoncogene tyrosine-protein kinase Fyn), Frk (Fyn-related kinase), Hck (hematopoietic cell kinase), Lck (lymphocyte specific kinase), Lyn (tyrosine-protein kinase Lyn), Yes (yamaguchi sarcoma), Yrk (Yes-related kinase), and Srms (Src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites) [8,9]. Degli 11 membri delle SFK, Src, Fyn e Yes sono implicati nella tumorigenesi e

nella formazione di metastasi [10]. Infatti, Src, Fyn, Yes, ma anche Frk sono ampiamente espressi in una varietà di tessuti mentre per Blk, Fgr, Hck, Lck e Lyn l'espressione proteica è più ristretta nei tessuti, con una prevalenza nelle cellule di origine ematopoietica [11]. Yrk, invece, è stato descritto solo nel pollo adulto ed è stato rilevato nelle cellule ematopoietiche, nel cervelletto, ma anche nella milza, nei polmoni e nella pelle [12]. Nei tumori solidi, è stata osservata un'aumentata espressione di molti membri della famiglia. Anche per i membri che sono espressi principalmente nelle cellule ematologiche normali, è stata frequentemente riportata una presenza nei tessuti tumorali non ematologici (Tabella 1) [13,14].

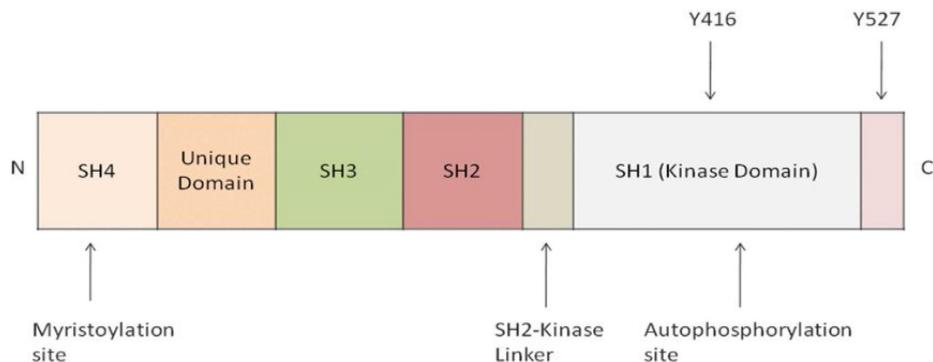
Gene	Expressing Tissues	Subfamily	Chromosomal Locus
<b>Src</b>	Ubiquitous	SrcA	20q11
<b>Fyn</b>	Brain, endocrine tissues, female tissues, hematopoietic cells, liver	SrcA	6q21
<b>Yes</b>	Ubiquitous	SrcA	18q2
<b>Hck</b>	Hematopoietic cells, lung	SrcB	20q11
<b>Lck</b>	Hematopoietic cells	SrcB	1p35
<b>Lyn</b>	Ubiquitous	SrcB	8q13
<b>Blk</b>	Hematopoietic cells, lung	Other	8p22
<b>Frk</b>	Ubiquitous	Other	6q21
<b>Yrk</b>	Neural, hematopoietic tissues	Other	1p36
<b>Fgr</b>	Hematopoietic cells, lung	Other	1p36
<b>Srms</b>	Gastrointestinal, male tissue	Other	20q13

*Tabella 1. Le chinasi della famiglia Src. Tratto e modificato da Src Family Kinases as Therapeutic Targets in Advanced Solid Tumors: What We Have Learned so Far. Cancers (Basel). 2020 Jun 2;12(6):1448.*

### 1.1.1 La struttura della Tirosin-chinasi Src

Gli SFK mostrano una grande sequenza e somiglianza strutturale. La sequenza più variabile tra gli SFK è localizzata nel “dominio unico” che collega i domini SH3 e SH4, ma al quale solo in pochi casi è stato assegnato uno specifico ruolo regolatorio [15]. Src è composto da diversi domini funzionali, connessi da una singola catena proteica [16]. Presenta una struttura conservata che include una regione N-terminale, una porzione di acido miristico attaccata al dominio SH4, il dominio unico, il dominio SH2 e SH3, un dominio linker, il dominio SH1 (dominio catalitico) che contiene il sito attivo della chinasi e, infine, una breve coda C-terminale che contiene una Tyr in posizione 527 (in c-Src) (Figura 1).

Durante la biosintesi, la metionina ammino-terminale è rimossa e la glicina ammino-terminale risultante diventa miristoilata in seguito ad una reazione con il miristoil-CoA. La miristoilazione facilita l'associazione di Src alla superficie interna della membrana cellulare [17].



*Figura 1. Struttura dei domini della tirosin-chinasi Src. Src è composto da una sequenza di miristoilazione N-terminale (Myr) attaccata al dominio SH4, un dominio unico seguito dai domini SH3 e SH2, una regione linker, un dominio catalitico (dominio SH1) che contiene Tyr416 e un dominio C-terminale che contiene Tyr527. Tratto da The importance of Src signaling in sarcoma. Oncol Lett. 2015 Jul;10(1):17-22.*

La regione N-terminale contiene una porzione di acido miristico a 14 atomi di carbonio essenziale per la localizzazione sulla superficie interna della membrana cellulare.

Questa porzione è attaccata al dominio SH4 (Src Homology 4) il quale include i primi 16 residui amminoacidici ed è responsabile dell'interazione delle SFK con le membrane cellulari. È noto che le SFK sono localizzate sul lato citosolico della membrana plasmatica, anche se possono essere associate a endosomi, vescicole secretorie, apparato di Golgi, mitocondrio e membrana perinucleare [18].

Il dominio unico, formato da 40-70 residui, è diverso tra i diversi membri della famiglia Src, si ritiene infatti che fornisca funzioni e specificità uniche a ciascun membro.

Il dominio SH3 (Src Homology 3), costituito da 50-60 residui amminoacidici, è in grado di legare sequenze ricche di prolina, in particolare quelle che portano il motivo PXXP, facilitando interazioni SFK-substrato o interazioni intramolecolari coinvolte nel controllo dell'attività enzimatica, dell'interazione con i substrati e della localizzazione sub-cellulare. [19]. Il dominio presenta una struttura a  $\beta$  barile con 5 foglietti antiparalleli e 2 loops denominati RT e n-Src. Quest'ultimi si trovano alla fine di una superficie ricca di amminoacidi aromatici ed idrofobici che delimita la regione di riconoscimento del motivo PXXP presente nella proteina partner. L'interazione mediata dal dominio SH3 con la sequenza PXXP della proteina partner è a bassa affinità tanto che variazioni della sequenza amminoacidica del dominio possono aumentare o diminuire l'affinità di legame con il substrato.

Il dominio SH2 (Src Homology 2) è costituito da circa 100 residui aminoacidi e modula anch'esso, mediante interazione proteina-proteina, l'attività catalitica o il riconoscimento dei substrati. Il dominio ha una struttura a foglietto  $\beta$  centrale e 2 singole  $\alpha$  eliche ai lati di quest'ultimo.

Il dominio linker è coinvolto nel legame intramolecolare con il dominio SH3.

Il dominio SH1 (Src Homology 1), chiamato anche dominio catalitico, è costituito da circa 260 amminoacidi ed è responsabile dell'attività enzimatica. SH1 presenta una struttura bilobata comune a tutte le Ser/Thr e Tyr-chinasi, con un piccolo lobo N - terminale (costituito dai residui 267-337) e un grande lobo C-terminale (costituito dai

residui 341-520), collegati da una catena flessibile, denominata regione cerniera (Figura 2).

Il lobo N-terminale (o piccolo lobo) è costituito da 5 foglietti  $\beta$  ed una singola  $\alpha$  elica (chiamata anche elica C); invece, il lobo C-terminale (o grande lobo) è costituito prevalentemente da  $\alpha$  eliche. Il piccolo lobo è coinvolto primariamente nell'ancoraggio e nell'orientamento dell'ATP. Il legame con il nucleotide fosfato è coordinato in parte da una zona ricca in glicina detta G-loop (è comunemente chiamata anche P-loop dove P indica il gruppo fosfato dell'ATP). Il grande lobo, invece, è coinvolto nel legame con il substrato e contiene il sito di attivazione nel quale è presente la Tyr416, la cui fosforilazione determina la completa attivazione dell'enzima. Nella fessura tra i due lobi si trova il sito catalitico dove avviene il trasferimento del fosfato dall'ATP al substrato. I due lobi si muovono l'uno rispetto all'altro e possono aprire o chiudere la fessura del sito attivo tale da promuovere o inibire l'attività enzimatica. La conformazione aperta della proteina è necessaria per consentire l'accesso di ATP al sito catalitico e il rilascio di ADP; la conformazione chiusa, invece, è necessaria per portare i residui allo stato cataliticamente attivo.

Nel core catalitico si trovano diversi residui amminoacidi altamente conservati: la Lys295 implicata nella formazione di legami ionici con i fosfati  $\alpha$  e  $\beta$  dell'ATP; l'Asp386, chiamato anche base catalitica, è responsabile dell'orientazione dei gruppi tirosinici del substrato ed è un accettore di protoni da parte della Tyr che deve essere fosforilata facilitando l'attacco nucleofilo del fosforo  $\gamma$  dell'ATP. Un altro residuo fondamentale che si trova nel loop di attivazione del grande lobo è l'Asp404, il quale lega gli ioni  $Mg^{2+}$  che coordinano i fosfati  $\beta$  e  $\gamma$  dell'ATP [16, 20]. La transizione dalla forma inattiva a quella attiva della chinasi è definita da modifiche conformazionali per cui  $\alpha$ -elica C ruota e facilita la formazione del ponte salino tra la Glu310 e la Lys295, tanto che quest'ultima può così coordinare al meglio le molecole di ATP. Il loop di attivazione, invece, assume una forma più distesa permettendo ai substrati di inserirsi nel sito attivo ed alla Tyr416 di essere fosforilata stabilizzando la chinasi in conformazione attiva [17, 20].

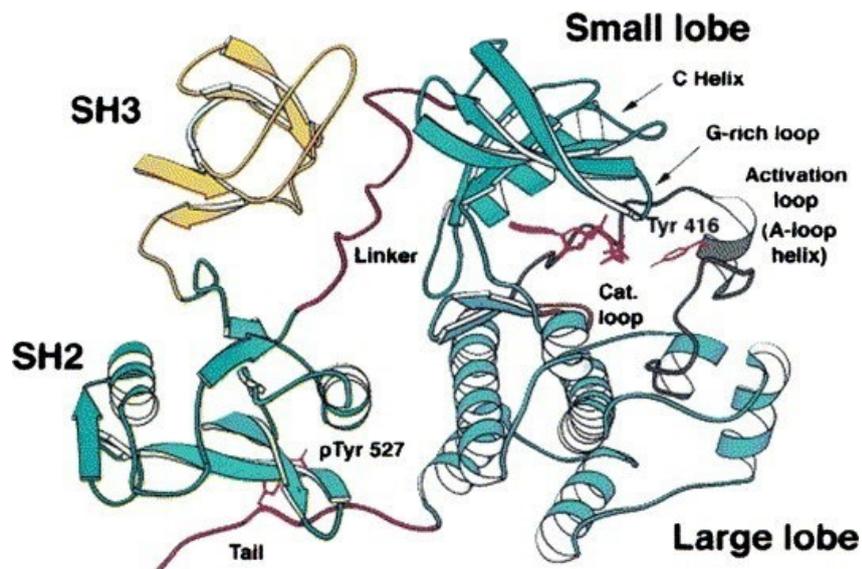


Figura 2. Rappresentazione a nastro della struttura di Src umana. Il loop di attivazione è tra i due lobi della chinasi e sequestra la Tyr416. Tratto da *Biochem Biophys Res Comm*, 2004. 324: 1155-1164.

La regione C-terminale è costituita da circa 15-17 residui amminoacidici e contiene una Tyr in posizione 527 (in c-Src) altamente conservata in tutte le SFK. La Tyr527 è un'importante sito regolatorio in quanto la sua fosforilazione determina dei cambiamenti conformazionali dovuti all'interazione intramolecolare della pTyr527 con il dominio SH2, tali da inattivare la chinasi. Nell'enzima inattivo, né il dominio SH2 né SH3 sono facilmente accessibili ai ligandi esterni.

## 1.2 La regolazione dell'attività di Src

Esistono diversi modi in cui l'attività di Src può essere regolata e ognuno di questi potrebbe contribuire alla sua attivazione nelle cellule tumorali. L'attività di Src è regolata, a livello cellulare, dallo stato di fosforilazione di due residui chiave di tirosina e dalle interazioni con i ligandi mediate dai suoi domini regolatori, che stabilizzano la chinasi in conformazione attiva o inattiva. La forma chiusa (inattiva)

e la forma aperta (attiva) delle SFK esistono in un dinamico equilibrio (Figura 3). Nella configurazione inattiva, il dominio SH2 lega la Tyr527 fosforilata nel dominio C-terminale, mentre il dominio SH3 interagisce con il dominio linker sul retro del dominio catalitico, promuovendo così una conformazione chiusa che impedisce l'interazione con i substrati. Nella configurazione attiva, la Tyr527 è defosforilata e i domini SH2 e SH3 sono rilasciati da interazioni intramolecolari e quindi disponibili per il legame con partner molecolari eterologhi; questa conformazione aperta permette anche l'auto-fosforilazione di Tyr416. All'auto-fosforilazione se consegue l'attivazione dell'enzima.

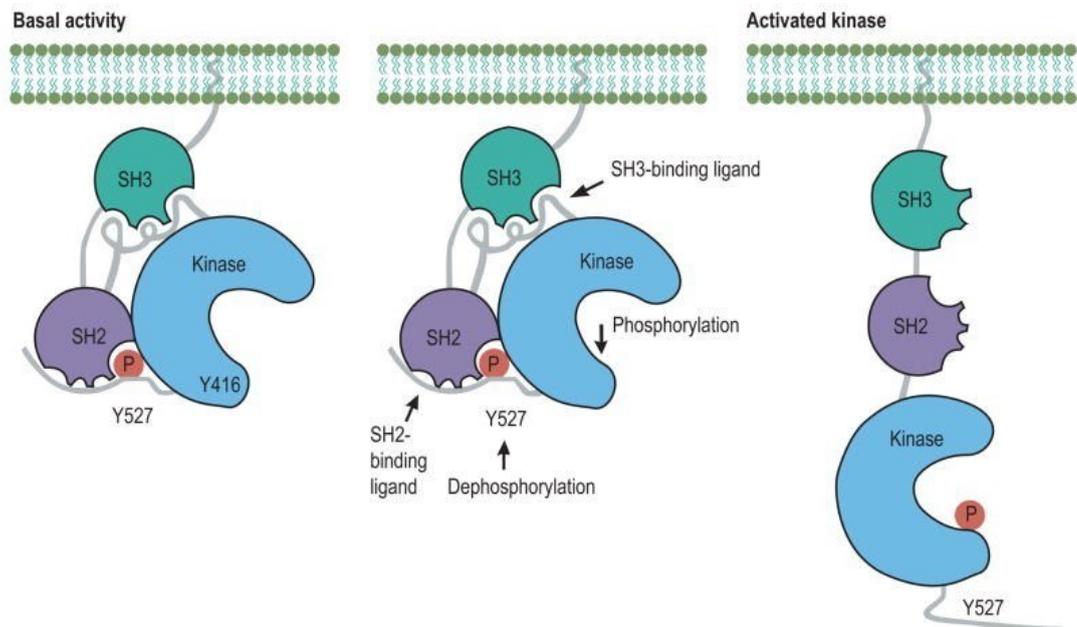


Figura 3. Rappresentazione dell'attivazione della tirosina chinasi Src. Il pannello di sinistra rappresenta la conformazione chiusa (inattiva) di Src in cui Tyr527 interagisce con il dominio SH2, posizionando il dominio SH3 per interagire con il linker tra SH2 e domini catalitici. Il pannello centrale illustra i diversi meccanismi coinvolti nell'attivazione di Src e il pannello di destra rappresenta la conformazione aperta (attiva). Tratto da *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:467–475.

### 1.2.1 Regolazione di Src da parte di Csk e Chk

La fosforilazione della Tyr527 e di conseguenza l'inattivazione dell'enzima è determinata dall'azione di due tirosin-chinasi: Csk (C-terminal Src kinase) e il suo omologo Chk (Csk-homologous kinase) [21]. Strutturalmente sono simili alle SFK, mancano però del sito di acilazione nella regione N-terminale, del sito di autofosforilazione nel dominio catalitico e della tirosina inibitoria nel segmento C-terminale. Queste tirosin-chinasi sono principalmente localizzate nel citosol e poiché le SFK sono ancorate alle membrane, l'azione di inibizione di Csk e Chk sarà legata alla loro capacità di traslocare, interagendo con proteine di membrana o con adattatori mediante i loro domini regolatori SH3, SH2 e dominio catalitico. Mentre Csk è ubiquitariamente espressa, l'espressione di Chk è limitata al seno, alle cellule ematopoietiche, ai neuroni e ai testicoli [17].

Csk agisce sopprimendo l'attività di Src, mediante la fosforilazione dei residui di tirosina, situati all'estremità C-terminale. Chk, invece, oltre a inattivare Src mediante fosforilazione catalitica, forma un complesso inibitorio non covalente con l'enzima e di conseguenza l'associazione di Chk con la forma attivata di Src inibisce la sua attività chinasi. L'azione di Chk prevale quindi su quella di Src. Chk può anche legarsi a Src non fosforilato e prevenirne l'autofosforilazione.

La chinasi Csk rappresenta il principale regolatore negativo di Src e in condizioni basali in vivo, il 90-95% di Src è fosforilato nella Tyr527. L'importanza di tale fosforilazione nel meccanismo di inibizione dell'attività dell'enzima è suggerita da evidenze sperimentali in cui i mutanti di Src presentano una costitutiva attività basale associata alla trasformazione oncogenica [22].

### 1.2.2 Regolazione dell'attività di Src da parte delle fosfatasi

La destabilizzazione della forma chiusa dell'enzima è determinata da diversi fattori: la defosforilazione della coda C-terminale, come anche la delezione o la mutazione di tale regione; la destabilizzazione delle interazioni intramolecolari di SH2 e SH3 dipendenti mediante l'ausilio di ligandi esterni; l'autofosforilazione della Tyr416 [23]. Ciò che ne consegue è l'attivazione dell'enzima.

Differenti protein tirosina fosfatasi (PTP) sono coinvolte nel meccanismo di defosforilazione della coda C-terminale e di conseguenza sono responsabili della regolazione della sua attività chinasi. Nella conformazione aperta, infatti, i residui inibitori della tirosina sono accessibili alla fosfatasi e la defosforilazione coincide con la distruzione di tutte le interazioni intramolecolari e la fosforilazione del sito di attivazione che induce una completa attivazione della chinasi.

In letteratura sono descritte diverse tirosin-fosfatasi implicate nel meccanismo di defosforilazione delle SFK in vari sistemi cellulari: (i) tyrosine-phosphatase 1B (PTP1B), (ii) tirosin-fosfatasi transmembrana CD45 e (iii) tirosin-fosfatasi contenenti due domini SH2 in tandem SHP-1 e SHP-2.

La PTP1B è stata la prima tirosin-fosfatasi identificata. Essa è ubiquitariamente espressa ed è sovraregolata in molti tumori solidi umani. Inoltre, è responsabile della defosforilazione di Tyr527 e quindi della successiva attivazione di Src e ciò che ne consegue è l'aumento dell'insorgenza dei tumori [24, 25].

La CD45, presente sulla membrana plasmatica e abbondantemente espressa in tutte le cellule nucleate di origine emopoietica, è la più importante fosfatasi che attiva le SFK, in seguito alla defosforilazione della coda C-terminale [26, 27].

Le SHP-1 e SHP-2, invece, sono due tirosin-fosfatasi localizzate nel citosol contenenti due domini SH2 al lato N-terminale ed un dominio catalitico nella coda C-terminale [28]. SHP-1 è presente principalmente nelle cellule di origine ematopoietica, invece, SHP-2 è ubiquitariamente espresso. Benché siano strutturalmente correlate, SHP-1 e SHP-2 svolgono diversi ruoli nella trasduzione del segnale: mentre SHP-1 ha effetti di tipo inibitorio, è infatti coinvolta nella defosforilazione e quindi nell'attivazione di Src, SHP-2 è coinvolta nella trasduzione del segnale che determina attivazione cellulare [29]. SHP-2 può regolare l'attività di Src con differenti modi: mediante un meccanismo enzimatico che coinvolge la defosforilazione della coda C-terminale e un meccanismo non enzimatico legato al reclutamento di Csk nella membrana plasmatica. In questo caso, SHP-2 catalizza la defosforilazione della proteina PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomainsfosfo), che a loro volta non è in grado di reclutare Csk.

La defosforilazione della proteina PAG coincide quindi con la mancata localizzazione alla membrana di Csk che non è quindi in grado di defosforilare la Tyr527 e di conseguenza vi è l'incapacità di inibire le SFK [30].

Poiché l'attività di Src è finemente regolata nelle normali condizioni cellulari, una modifica dei meccanismi che la governano può determinare una costitutiva attivazione dell'enzima, che può quindi portare all'insorgenza del cancro.

### 1.3 Il ruolo di Src nella trasduzione del segnale

Il dominio SH3 consente l'associazione con i filamenti di actina che guidano la traslocazione delle SFK verso la periferia cellulare dove possono interagire con altri partner molecolari, consentendo due importanti eventi di trasduzione: (i) segnalazione dai recettori del fattore di crescita, che influenza principalmente la crescita cellulare, (ii) segnalazione dai recettori di adesione incluse integrine ed E-caderina, che regolano principalmente le funzioni del citoscheletro [31]. Src quindi è attivato dalla stimolazione di varie molecole di superficie come i recettori della membrana plasmatica, tra cui il recettore tirosina chinasi (RTK) e le integrine. Una volta attivato, è il punto di partenza di diverse cascate biochimiche che propagano i segnali generati extracellulari lungo le vie di trasduzione intracellulare interconnesse (Figura 4). Src, non solo promuove la crescita delle cellule tumorali, ma è anche coinvolto nel controllo dell'adesività e della migrazione, funzionando come una molecola chiave che regola i percorsi di trasduzione del segnale innescati dalle molecole di superficie [32].

Come bersagli a valle del recettore RTK, Src influenza la proliferazione cellulare attraverso la via Ras/ERK/MAPK e regola l'espressione genica e l'angiogenesi tramite fattori di trascrizione come le molecole STAT.

Src, inoltre, può attivare la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K), che porta all'attivazione della proteina chinasi B (AKT) e di conseguenza promuove la sopravvivenza e la crescita delle cellule tumorali [33].

Src può interagire anche con le integrine, le quali possono alterare il comportamento cellulare attraverso il reclutamento e l'attivazione di proteine di segnalazione come la chinasi di adesione focale (FAK). FAK è un effettore di Src che può legarsi ai domini SH e portare all'attivazione della chinasi [34]. In seguito a tale interazione si forma un complesso a doppia chinasi, denominato il complesso FAK-Src, in grado di legarsi e fosforilare varie proteine adattatrici, come p130CAS e paxillina

e di conseguenza si promuove la motilità, l'adesione e la migrazione cellulare [35]. Studi recenti hanno scoperto che il complesso FAK-Src è attivato in molte cellule tumorali e genera segnali che portano alla crescita del tumore e alla metastasi.

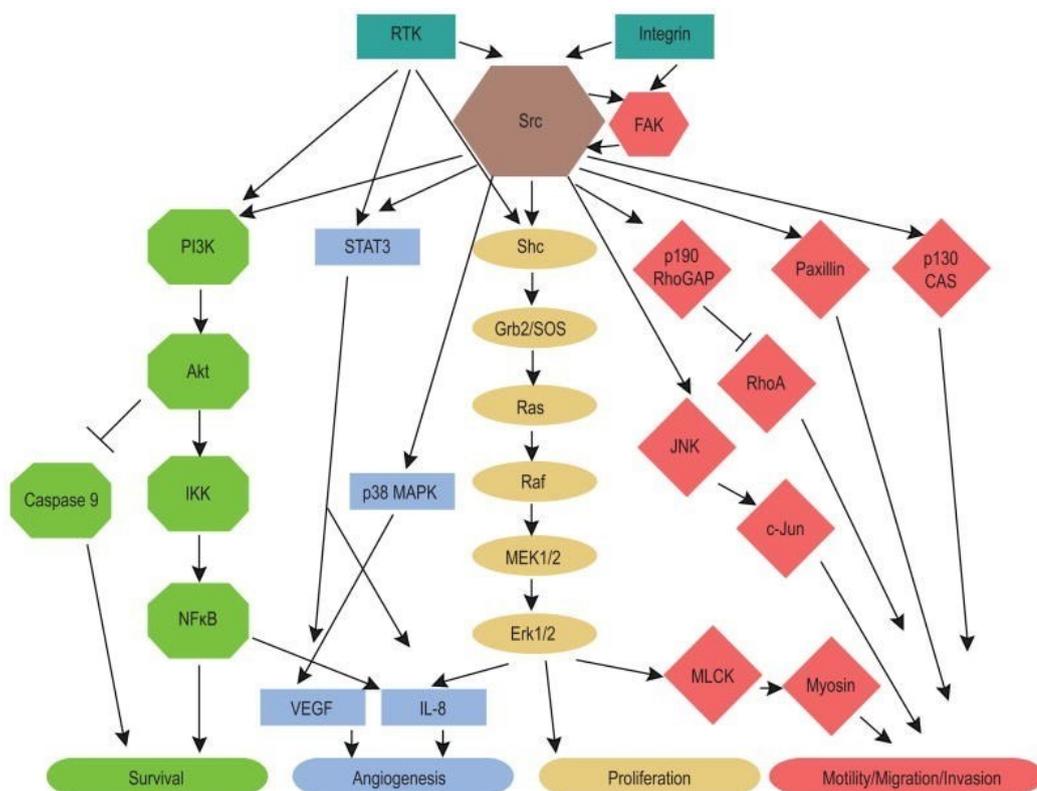


Figura 4. Vie di trasduzione del segnale mediate da Src. CAS = Crk-associated substrate; ERK = extracellular signal-regulated kinase; FAK = focal adhesion kinase; IKK = IκB kinase; IL-8 = interleukin 8; JNK = Jun N-terminal kinase; MAPK = mitogen-activated protein kinase; MEK = mitogen-activated protein kinase kinase MAPK/ERK kinase; MLCK = myosin light chain kinase; NFκB = nuclear factor κB; PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase; RhoGAP Rho GTPase-activating protein; RTK = receptor tyrosine kinase; SOS = son of sevenless; STAT3 = signal transducer and activator of transcription 3; VEGF = vascular endothelial growth factor. Tratto da *The role of Src in solid tumors. Oncologist. 2009 Jul;14(7):667-78*

#### 1.4 Src e la progressione tumorale

In condizioni normali Src regola le attività di base della cellula, ed è per questo motivo che è coinvolto nella progressione tumorale, un processo in cui queste funzioni sono profondamente interrotte. La sua attivazione oncogenica può indurre da un lato un aumento della crescita e della sopravvivenza cellulare, che rappresenta la formazione di massa tumorale e dall'altro può promuovere la riorganizzazione del citoscheletro dell'actina e la diminuzione dell'adesione cellula-cellula e della matrice cellulare, che alla fine facilitano la motilità e l'invasione [36]. In effetti, la maggior parte delle evidenze suggerisce che Src ha un ruolo predominante nel mantenimento del fenotipo neoplastico e nella progressione tumorale, piuttosto che nell'insorgenza o nella crescita del tumore [15]. Durante la progressione tumorale, l'attività di Src diventa anormalmente elevata e poiché l'attivazione della mutazione o l'amplificazione di Src sono molto rare nei tumori umani, un alterato controllo estrinseco della fosforilazione di Src da parte della chinasi o della fosfatasi può rappresentare un importante meccanismo di sovraregolazione di Src. L'attività di Src è elevata in diversi tipi di cancro umano. Il suo ruolo nella progressione, nel mantenimento e nella sopravvivenza del tumore è stato associato a diversi tumori solidi ed ematologici, come il tumore al colon, mammella, polmoni, fegato, prostata, pancreas, glioblastoma multiforme (GBM), neuroblastoma (NB), leucemia mieloide cronica e linfomi.

Dato il coinvolgimento di Src nella migrazione e nell'invasione del cancro, rappresenta un bersaglio promettente per gli stadi avanzati della progressione tumorale, suggerendo così l'uso ottimistico degli inibitori di tale enzima negli studi clinici [37].

#### 1.5 Inibitori di Src

Sono stati sviluppati e testati, in modelli preclinici, diversi inibitori di Src e molti di essi hanno raggiunto con successo l'uso clinico nei tumori ematologici. Sebbene nei tumori solidi tali composti abbiano costantemente confermato la loro capacità di bloccare la progressione delle cellule tumorali in diversi modelli sperimentali; il

loro utilizzo negli studi clinici ha svelato complicazioni inaspettate contro un utilizzo efficace nei pazienti.

Nelle normali condizioni cellulari esiste una vasta gamma di inibitori che coopera attivamente all'inattivazione dell'attività di Src e ciascun dominio dell'enzima rappresenta un possibile target di inibizione. La funzionalità di Src può essere quindi influenzata o inibita mediante l'uso di agenti farmacologici in grado di interagire con i domini o inducendo modificazioni covalenti che possano alterare l'attività o la localizzazione sub-cellulare della chinasi stessa.

Affinché una molecola sia utilizzata come inibitore/modulatore dell'attività Src deve presentare alcuni requisiti: (i) piccole dimensioni, (ii) permeabilità cellulare, (iii) elevata specificità o selettività, (iv) sufficiente potenza da poter competere con i ligandi endogeni. La specificità degli inibitori deriva dal fatto che i membri appartenenti ad una stessa famiglia presentano un elevato grado di omologia di sequenza [38].

Il lobo N-terminale del dominio catalitico è un importante bersaglio per lo sviluppo di inibitori di Src in grado di esercitare un meccanismo competitivo nei confronti dell'ATP. Molti dei composti attivi, naturali o di sintesi, presentano due anelli aromatici o etero-aromatici che favoriscono in un sistema di interazioni idrofobiche col sito di legame dell'ATP delle chinasi.

Tra i primi inibitori che sono stati studiati e testati si annovera il Dasatinib (BMS-354825, Sprycel) (Figura 5). Il Dasatinib è un inibitore competitivo del legame ATP. Si tratta di una piccola molecola disponibile per via orale che nel 2006 ha ricevuto l'approvazione della FDA per il trattamento della leucemia mieloide cronica e della leucemia linfoblastica acuta con il cromosoma Philadelphia positivo. Il Dasatinib ha una bassa specificità di inibizione e i suoi potenziali bersagli comprendono Src, BCR-Abl, c-kit, PDGFR e altri SFK, inclusi Lck, Fyn e Yes, con  $IC_{50} < 1,0$  nmol/L [39]. I dati preclinici suggeriscono che il Dasatinib potrebbe essere efficace anche nei tumori solidi e dal 2009 sono stati pubblicati numerosi risultati di studi di fase I/II condotti su diversi tipi di cancro [40]. Nonostante gli incoraggianti risultati preclinici, la convalida clinica di questi dati è stata in gran parte improduttiva [41]. Inoltre, i modelli preclinici disponibili si sono dimostrati in gran parte inadeguati nella loro capacità predittiva e sono necessarie nuove

strategie sperimentali che implementino le condizioni del microambiente. Infatti, l'attività di SFK dipende strettamente dalla composizione dell'ECM e un microambiente mutevole potrebbe avere un forte impatto sulle funzioni di SFK e quindi sull'efficacia del trattamento.

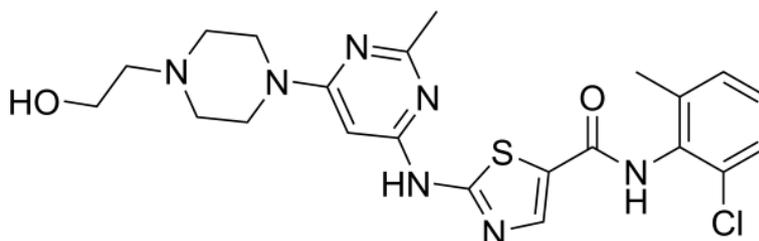


Figura 5. Struttura chimica del Dasatinib.

La collaborazione con la prof.ssa Silvia Schenone del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Genova ci ha permesso lo studio e la sintesi di nuovi inibitori di Src; questi composti sono i derivati pirazolo [3,4-d] pirimidinici e un esempio è dato dal composto Si306 (Figura 6). Si tratta di inibitori competitivi del legame con l'ATP e sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica [42]. Come potente inibitore di Src, si306 induce l'apoptosi e riduce la proliferazione nelle linee cellulari tumorali in cui l'enzima è sovraespresso o iperattivato, come nel caso del GBM e del NB [43, 44, 45]. Nonostante sia un composto promettente, sia per la sua attività che per le caratteristiche ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione), mostra dei limiti che sono rappresentati dalla sua bassa solubilità in acqua e dalla sua limitata capacità di essere formulato e somministrato per via parenterale [46]. Ed è per questo motivo che vengono sviluppati e sintetizzati i cosiddetti pro-drug, che sono composti caratterizzati da migliori proprietà ADME, una buona solubilità acquosa e una maggiore capacità di attraversare le membrane cellulari. Un esempio è dato dal PD1-si306, pro-drug di si306. I pro-drug sono quindi progettati per migliorare la biodisponibilità, nel momento in cui un farmaco è scarsamente assorbito dal tratto gastrointestinale.

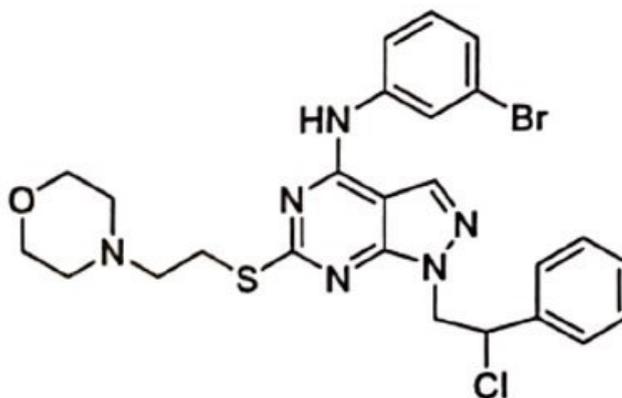


Figura 6. Struttura chimica di si306

## 1.6 Modelli cellulari 2D

Lo studio delle patologie neoplastiche è stato condotto per anni principalmente su sistemi in vitro sviluppati in due dimensioni (2D). Colture di cellule immortalizzate e adese a supporti di varia natura, sono state usate nella speranza potessero mimare i più complessi sistemi tridimensionali di sviluppo tumorale in vivo. Dal punto di vista tecnico, le colture cellulari bidimensionali riflettono solo parzialmente il pattern morfo-molecolare delle cellule tumorali umane e non possono imitare il microambiente tumorale naturale, a causa della mancanza di comunicazione cellulare (cellula-cellula) e interazione cellula-cellula e cellula-matrice. Nei sistemi in vivo, inoltre, lo sviluppo neoplastico differisce significativamente rispetto alle cellule coltivate in 2D, soprattutto per quanto riguarda la morfologia, la cinetica di crescita, l'espressione genica ed il grado di differenziamento cellulare [47]. Pertanto, la citotossicità e l'attività dei farmaci nei modelli di coltura cellulare 2D spesso non corrispondono completamente a quelle del tessuto in vivo [48].

I modelli 2D rappresentano il metodo più comune per gli studi del tumore in vitro, poiché è poco costoso, semplice e riproducibile. Inoltre, offre un ambiente cellulare ben controllato ed omogeneo che facilita l'analisi microscopica e sostiene la proliferazione delle diverse linee cellulari. Tuttavia, questo metodo di coltura

mostra diverse limitazioni come: proliferazione cellulare non realistica, scarso differenziamento cellulare, diminuzione della resistenza ai farmaci e risposta imprecisa a stimoli meccanici o chimici [49]. Di conseguenza questi limiti portano a forti discrepanze rispetto alle controparti in vivo in termini di proliferazione, migrazione, morfogenesi, differenziamento cellulare, espressione di geni e proteine, trasduzione del segnale e reattività agli stimoli [50, 51]. Ed è per questo motivo che il modello preclinico 2D è considerato un sistema non ottimale, infatti, le cellule rispondono in maniera diversa ai farmaci antitumorali quando vengono coltivate in 2D rispetto al 3D [52].

Per superare questi limiti, i sistemi di coltura tridimensionali (3D) sono sempre più sviluppati nella ricerca e sono diventati essenziali per lo studio dei tumori.

### 1.7 Sferoidi 3D

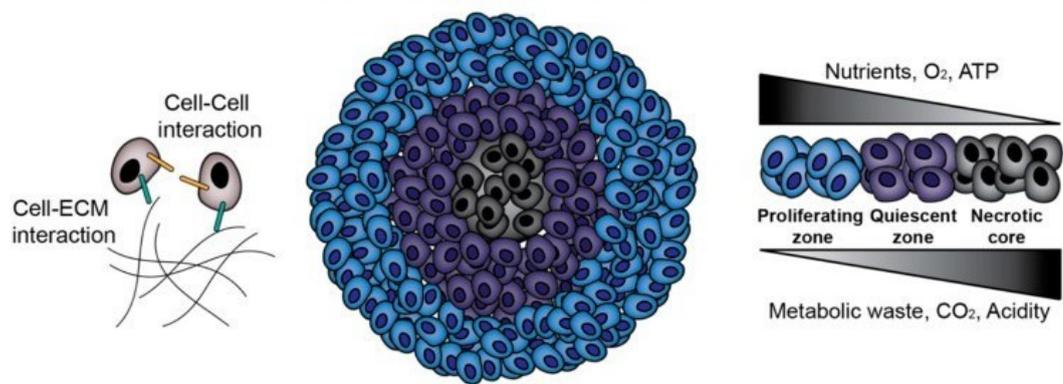
Il microambiente tumorale è noto per essere complesso, sia nel suo contenuto che per la sua natura dinamica, che è difficile da studiare utilizzando modelli di colture cellulari bidimensionali (2D). Al contrario, modelli cellulari tridimensionale come gli sferoidi, mostrano caratteristiche molecolari peculiari che si discostano dalle colture in monostrato, ma che si avvicinano maggiormente all'architettura strutturale del tumore in vivo. Tali modelli, infatti, sono in grado di imitare in modo più accurato sia la struttura del tessuto maligno che il suo microambiente, come anche le risposte fisiologiche, la secrezione di mediatori solubili, l'espressione genica, i modelli e i meccanismi di resistenza ai farmaci.

Le cellule tumorali all'interno dello sferoide riproducono la stessa disposizione concentrica dei tumori, infatti, presentano uno strato esterno proliferativo, uno strato intermedio quiescente ed un core ipossico e necrotico a causa della limitata diffusione di ossigeno, nutrienti, fattori di crescita e accumulo di scorie metaboliche che provoca una forte diminuzione del pH del microambiente cellulare (Figura 7). Inoltre, in ambienti ipossici, le cellule cancerose convertono il piruvato in lattato per ottenere energia, attraverso un processo che è noto come effetto Warburg.

L'accumulo di lattato negli sferoidi è responsabile dell'acidificazione del suo interno (pH 6,5–7,2), che si trova anche all'interno di tumori solidi [53, 54]. Gli sferoidi,

inoltre, hanno un pattern di crescita simile ai tumori solidi nello stadio iniziale non vascolarizzato [55].

L'uso di saggi cellulari 3D aggiunge valore agli studi di ricerca e screening per identificare potenziali composti antitumorali, colmando le lacune di predittività esistenti tra le colture cellulari 2D e i modelli animali. La scarsa penetrazione dei farmaci attraverso gli scaffold e le barriere del microambiente sferoidale sono la causa della maggiore resistenza [56]. Pertanto, è necessario sviluppare farmaci con una migliore capacità di penetrazione nelle sezioni più interne dei tumori [57].



*Figura 7. Rappresentazione della struttura dello sferoide. Gli sferoidi forniscono una piattaforma in vitro per lo studio delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (ECM), ed inoltre imitano i tumori solidi in vivo in termini di gradienti di nutrienti, ossigeno e pH e formazione di zone necrotiche. Tratto da Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids. Polymers (Basel). 2020 Oct 28;12(11):2506.*

### 1.7.1 Tecnica “hanging drop”

Una struttura 3D ben definita e un’uniformità geometrica sono requisiti fondamentali per la formazione di colture cellulari efficienti. Gli sferoidi possono essere ottenuti utilizzando diverse tecniche che consentono l’aggregazione delle cellule, promuovendo l’adesione cellulare ed evitando l’interazione cellula-superficie di contatto [58].

Una delle tecniche più utilizzate per la produzione di sferoidi è il metodo hanging drops [59] (Figura 8). Si tratta di un metodo semplice, che può essere utilizzato con diverse linee cellulari e permette la produzione di sferoidi di dimensioni omogenee e compatti e questo è un requisito fondamentale per la formazione di colture cellulari efficienti. Il metodo prevede la deposizione di un piccolo volume di cellule nel coperchio di una piastra petri. Invertendo la piastra si forma una goccia “pendente” e le cellule, per gravità, si accumulano nel fondo della goccia, tendendo quindi ad aggregarsi in sferoidi.

Tale tecnica ha il vantaggio di poter formare singoli sferoidi di dimensioni uniformi, non necessita l’utilizzo di piastre rivestite ed inoltre non richiede particolari attrezzature. Tuttavia, non mancano gli svantaggi: comporta un intenso lavoro manuale per la raccolta dei singoli sferoidi, il cambio del terreno di coltura è difficile ed è per questo motivo che è utile solo per colture cellulari a breve termine.

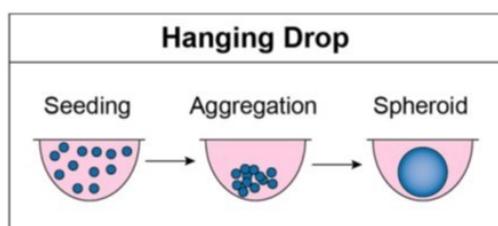


Figura 8. Rappresentazione schematica della tecnica della goccia sospesa. Tratto e modificato da *Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids*. *Polymers (Basel)*. 2020 Oct 28;12(11):2506.

### 1.7.2 Altre tecniche di coltura cellulare 3D

Gli sferoidi possono formarsi anche mediante l'uso di altre tecniche come: la tecnica del pallone rotante, la sovrapposizione del liquido statico, e la levitazione magnetica (Figura 9).

Una strategia introdotta da decenni, ma ancora diffusa, prevede l'impiego di un'agitazione continua della sospensione cellulare all'interno di spinner flasks (Figura 9 A), in tal modo si formano spontaneamente aggregati sferici e si previene l'adesione ad altri substrati [60]. Quindi in questo metodo è il movimento rotatorio continuo che favorisce l'adesione cellula-cellula. Importante è considerare la velocità di rotazione, dato che basse velocità potrebbero provocare l'assestamento delle cellule, invece, velocità elevate potrebbero provocare il loro danneggiamento. Un vantaggio dell'utilizzo di tale tecnica è la capacità di ottenere un numero elevato di sferoidi di dimensioni eterogenee ed è per questo motivo che rappresenta un metodo adatto per la produzione su larga scala.

Nella tecnica della sovrapposizione del liquido statico (LOT), le cellule risospese sono seminate su un substrato non aderente, che induce la loro aggregazione, anziché aderire ad una superficie (Figura 9 B).

Un'altra tecnica utilizzata per la formazione di sferoidi è la levitazione magnetica (Figura 9 C) che consente alle cellule di formare sferoidi attraverso l'applicazione di un campo magnetico [61]. Prima dell'applicazione della forza magnetica, le cellule vengono caricate con nanoparticelle magnetiche e l'applicazione della forza magnetica per unire le cellule facilita l'adesione cellula-cellula consentendo la formazione degli sferoidi. Va considerato che è necessario usare un campo magnetico entro 30-500 giri, poiché è stato dimostrato anche che un campo magnetico più elevato influenzi il comportamento cellulare [62].

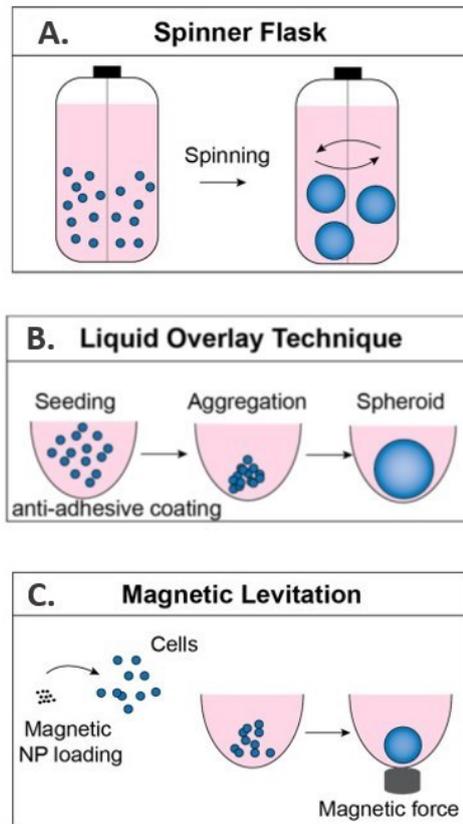


Figura 9. Rappresentazione schematica di altre tecniche di formazione degli sferoidi. (A) Tecnica del pallone rotante (B) Tecnica di sovrapposizione liquida (LOT) (C) Tecnica della levitazione magnetica. Tratto e modificato da *Natural and Synthetic Biomaterials for Engineering Multicellular Tumor Spheroids. Polymers (Basel). 2020 Oct 28;12(11):2506.*

### 1.8 Matrice per colture cellulari 3D

Le strutture 3D imitano in maniera accurata le complesse interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare (ECM), mantenendo la morfologia cellulare e dell'eterogeneità che caratterizza i tessuti fisiologici. Questo è un requisito fondamentale, poiché sia la morfologia che le interazioni cellula-ambiente influenzano fortemente il comportamento cellulare e le reti di segnalazione intercellulare [63]. L'ECM rappresenta la più complessa unità di organizzazione strutturale dei tessuti degli organismi viventi. I tessuti, infatti, non sono costituiti solo da cellule, ma una parte rilevante del loro volume è formata dallo spazio

extracellulare, occupato da un'intricata rete di macromolecole, la cui organizzazione tridimensionale rappresenta appunto l'ECM. L'ECM è un'impalcatura di proteine fibrillari non cellulari, varie macromolecole strutturali (proteine accessorie) e molecole adesive che forniscono supporto strutturale e biochimico alle cellule e sono essenziali per molti processi di base [64, 65]. Inoltre, forma siti di legame cellulare che controllano l'adesione e la migrazione cellulare [66]. L'ECM rappresenta il substrato su cui tutte le cellule dei tessuti possono aderire, migrare, proliferare e differenziare e di conseguenza può influenzare la loro sopravvivenza, la forma e la funzione cellulare. Infatti, le macromolecole dell'ECM sequestrano fattori di crescita, molecole come l'acqua o i minerali, e controllano fenomeni fisiologici, quali la morfogenesi; fenomeni fisiopatologici, quali la guarigione delle ferite; e fenomeni patologici, quali l'invasione e la metastatizzazione tumorale.

Per ottenere strutture 3D, le cellule vengono coltivate con delle matrici (o scaffold), in maniera tale da poter imitare un tessuto in vivo. Gli scaffold 3D vengono generati utilizzando vari polimeri naturali (collagene, gelatina, elastina, fibroina di seta, chitosano, chitina, fibrina, fibrinogeno, ecc.) e sintetici. Può essere utilizzato anche il composito di sostanze sia naturali che sintetiche. Questi compositi imitano la matrice extracellulare nativa per porosità, fibrosità, permeabilità e stabilità meccanica. La microarchitettura migliora l'interazione biofisica e biochimica delle cellule adese per essere meglio espresse in vitro. La matrice 3D fornisce un ambiente biologicamente attivo in cui le cellule possono proliferare, differenziarsi e secernere una matrice extracellulare specifica per le cellule che può essere potenzialmente utilizzata per una varietà di applicazioni.

Il collagene è il polimero più utilizzato, a causa dei principali elementi costitutivi della membrana basale, inoltre, rappresenta la proteina strutturale più abbondante nei tessuti umani costituendo circa il 30% della massa proteica totale del corpo. Il collagene può essere raggruppato in collagene fibrillare (collagene I-III, V e XI) o non fibrillare e svolge la funzione di regolare l'adesione, la migrazione cellulare e la resistenza alla trazione per mantenere l'omeostasi. Gli idrogel di collagene sono composti principalmente da collagene di tipo I. Il collagene di tipo I è il tipo più comune e come tale è il principale componente strutturale di molti tessuti [67]. In

quanto componente principale dell'ECM, svolge un ruolo chiave nello sviluppo e nella diffusione del cancro [68, 69]. A seconda del tipo di tessuto, le fibrille di collagene si organizzano in vari modi per formare fibre di collagene adatte alle funzioni e proprietà specifiche dei tessuti [70]. Le proprietà meccaniche, l'architettura e la biodegradabilità degli idrogel di collagene possono essere finemente modulate regolando le loro concentrazioni e i parametri di preparazione. La matrice di collagene di tipo I è usata comunemente nel sistema di coltura 3D. Ciò è dovuto dalla facilità di elaborazione, il basso costo e la flessibilità per la manipolazione delle cellule vive. Inoltre, la dimensione dei pori, la densità del ligando e la rigidità possono essere variate modificando la concentrazione di collagene o introducendo composti chimici di reticolazione, facilitando così la modifica delle proprietà strutturali del gel [71].

### 1.9 Il bioprinting 3D

Il vantaggio dell'utilizzo delle colture 3D rispetto a quelle 2D ha spinto allo sviluppo di nuovi metodi con lo scopo di superare i principali limiti dei modelli 3D, come la complessità della tecnica nell'esecuzione e nell'analisi, l'uniformità e la riproducibilità nella produzione di sferoidi di forma e dimensioni omogenee. Inoltre, questi modelli mancano della capacità di controllare l'organizzazione di più tipi di cellule in una complessa architettura 3D.

La biostampa 3D, invece, ha il potenziale per riprodurre in maniera più accurata il microambiente del tumore, rispetto ai metodi attuali (Figura 10). Si tratta di una tecnologia emergente che, tramite l'impiego di software e hardware dedicati per la progettazione di modelli 3D, ha lo scopo di produrre con precisione una struttura o un tessuto ingegnerizzato da poter impiegare direttamente sull'uomo, per riparare o sostituire i tessuti danneggiati o come materiale per test e studi biologici e farmacologici. Questa tecnica fornisce un'elevata riproducibilità e un controllo preciso sui costrutti prodotti in modo automatizzato, consentendo potenzialmente una produzione ad alto rendimento del modello 3D desiderato. Tali modelli stampati in 3D, possono quindi sostituire la coltura cellulare 2D convenzionale in

cui le cellule vengono coltivate in monostrato che quindi di conseguenza mancano principalmente delle dinamiche e complesse interazioni cellula-cellula e cellula-matrice [72,73]. La creazione di condizioni *in vitro* in grado di imitare più da vicino l'ambiente *in vivo* non solo sarà economicamente vantaggiosa, ma può contribuire all'identificazione di nuovi potenziali composti antitumorali. [74].



Figura 10. Biostampante 3D BIO X. Tratto da cellink.com.

### 1.9.1 Elementi chiave del bioprinting 3D

L'obiettivo del bioprinting 3D è stampare un tessuto o organi artificiali 3D composti da un'impalcatura, da cellule e da un microambiente che è in grado di imitare l'ambiente reale del corpo umano. Durante la progettazione di modello 3D ottimale è importante la valutazione di materiali biocompatibili (BioInk) con i suoi parametri come la porosità, interconnettività e le proprietà meccaniche.

- BioInk

Durante il processo di bioprinting, per creare costrutti di tessuto viene utilizzata una soluzione di un biomateriale o una miscela di diversi biomateriali sotto forma di idrogel, che incapsula i tipi cellulari desiderati, denominata bioink [75]. Questo

bioinchiostro può essere reticolato o stabilizzato durante o immediatamente dopo la biostampa per generare la forma, la struttura e l'architettura finale del costruito progettato. I bioinchiostri possono essere realizzati da soli da biomateriali naturali o sintetici o da una combinazione dei due come materiali ibridi.

Un bioink ideale dovrebbe possedere le proprietà fisico-chimiche desiderate, come adeguate caratteristiche meccaniche, reologiche, chimiche e biologiche [76].

Queste proprietà dovrebbero portare a: (i) la generazione di costrutti tissutali con adeguata resistenza meccanica e robustezza, pur mantenendo la meccanica di adattamento dei tessuti; (ii) gelificazione e stabilizzazione regolabili per favorire la biostampa di strutture con elevata fedeltà di forma; (iii) biocompatibilità e, se necessario, biodegradabilità che mimano il microambiente naturale dei tessuti; (iv) idoneità alle modifiche chimiche per soddisfare le esigenze specifiche dei tessuti; e (v) il potenziale per la produzione su larga scala con variazioni minime da lotto a lotto [77]. Poiché la determinazione della formulazione ottimale del bioink carica di cellule è il passo fondamentale verso il successo del bioprinting, ad oggi, vari biomateriali naturali e sintetici con caratteristiche specifiche sono stati utilizzati come substrato [78].

L'idrogel è il bioinchiostro più utilizzato, in quanto è dotato di proprietà biochimiche e meccaniche simili a quelle delle matrici extracellulari e permette l'incapsulamento delle cellule in un ambiente 3D che risulta essere allo stesso tempo altamente idratato e meccanicamente stabile. Gli idrogel sono reti composte da polimeri idrofili che non sono reticolati, e questo permette loro di gonfiarsi ampiamente da legami covalenti o di essere tenuti insieme da interazioni fisiche intramolecolari e intermolecolari mantenendo la loro struttura 3D [79, 80]. Grazie al loro carattere idrofilo possono assorbire una grande quantità di acqua o fluidi biologici e si gonfiano facilmente senza dissolversi, ed è per questo motivo che sono in grado di imitare le strutture e le proprietà fisiche dell'ECM dei tessuti.

Gli idrogel sono emersi come i più promettenti per la coltura cellulare poiché oltre ad imitare gli elementi salienti della matrice extracellulare, hanno una meccanica simile a quella di molti tessuti molli e possono supportare l'adesione cellulare. Questi bioinchiostri possono essere di due tipi: naturali o sintetici. I primi sono dei polimeri derivati da biomateriali presenti in natura (es. alginato, collagene, fibrina) e garantiscono un alto livello di biofunzionalità in quanto dotati delle stesse

caratteristiche degli ambienti extracellulari dove sono solitamente situate le cellule. I secondi invece sono costituiti da derivati di materiali artificiali e hanno il vantaggio di poter essere scelti e sintetizzati a seconda delle necessità fisiologiche del tessuto che si vuole stampare. Spesso però, quest'ultimi mostrano una minore biocompatibilità. Queste strutture modificate con polimeri possono essere utilizzate come matrice per la coltura cellulare in vitro o per creare sferoidi 3D [80].

L'idrogel a base di alginato di sodio è un materiale frequentemente utilizzato per la coltura cellulare, ma viene spesso utilizzato in combinazione con altri polimeri per consentire l'adesione delle cellule e la loro sopravvivenza. La combinazione di alginato di sodio e gelatina fornisce un eccellente idrogel da utilizzare come substrato utilizzato nella tecnologia di stampa 3D, grazie alle sue proprietà biologiche, come la sua biocompatibilità, biodegradabilità e non tossicità. Le proprietà meccaniche facilmente modificabili di questi materiali possono essere adattate al tessuto vivente, rendendoli ambienti ideali per lo sviluppo di colture cellulari, garantendo la loro sopravvivenza.

L'alginato è un polimero naturale derivato dalla parete cellulare di svariate alghe, costituito da unità di acido mannuronico e acido glucuronico, in proporzione variabile a seconda delle fonti vegetali. Può essere reticolato e formare gel ad alto assorbimento di acqua con cationi polivalenti che, in condizioni fisiologiche, formano ponti ionici tra le catene polimeriche e questa proprietà lo rende facilmente suscettibile all'incapsulamento delle cellule e al recupero delle stesse per applicazioni a valle. Ha una vasta gamma di applicazioni mediche specialmente nella stabilizzazione e nel trasporto di fattori chimici e nell'incapsulamento di cellule. È stato comunemente usato in biomedicina per la sua biocompatibilità, bassa citotossicità e basso costo [81, 82]. Il cross-link dell'alginato può essere facilmente indotto in presenza di cationi divalenti come  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$  formando ponti tra catene polimeriche, consentendo sia il cross-link che la solidificazione [83].

- Biocompatibilità

La biocompatibilità dei biomateriali è il primo parametro da considerare nella fabbricazione di scaffold e limita significativamente il numero di materiali idonei. È necessario che i materiali della struttura biostampata siano compatibili con

l'incapsulamento delle cellule, in maniera tale da poter supportare la crescita cellulare, l'adesione e la migrazione. Le caratteristiche fisiche dei biomateriali determinano il tipo di stampa ottimale. Ad esempio, i materiali a bassa viscosità sono più adatti per il bioprinting, perché migliorano la vitalità delle cellule in un ambiente a bassa pressione. Anche altre proprietà del materiale, come la dimensione dei pori e l'interconnettività, influenzano la crescita delle cellule incapsulate nella matrice [84].

- Porosità e interconnettività

La forma, il volume, le dimensioni e la geometria dei pori influenzano direttamente il comportamento delle cellule dopo l'adesione allo scaffold. Diverse dimensioni dei pori nelle matrici possono influenzare lo sviluppo della matrice extracellulare e sono strettamente correlate con l'organizzazione cellulare, l'assemblaggio del collagene I e la mineralizzazione [85]. I pori aperti e interconnessi sono fondamentali per consentire il trasporto di ossigeno e sostanze nutritive all'interno ed eliminare le scorie generate dal metabolismo cellulare. Inoltre, l'adesione cellulare, la vitalità e la proliferazione sono state fortemente influenzate dalla dimensione e dalla forma dei pori.

- Proprietà meccaniche

I parametri fisici sono una parte indispensabile degli scaffold di ingegneria tissutale, in particolare per la rigenerazione di tessuti come ossa e cartilagini. È molto importante una resistenza meccanica adeguata che corrisponda a quella delle ossa naturali. Quando le ossa artificiali con moduli elastici elevati vengono impiantate in situ, possono produrre una protezione dallo stress e ostacolare la formazione di nuovo osso.

### 1.9.2 Bioprinting basato sull'estrusione

Il bioprinting basato sull'estrusione è il sistema più comune e affidabile per la stampa 3D di tessuti biologici ed è caratterizzato dall'erogazione robotica di un flusso continuo di bioinchiostri, sotto forze pneumatiche o motorizzate [86] (Figura

11). Questa tecnica ha il vantaggio di essere compatibile con un range molto vasto di biomateriali. Esso, infatti, permette sia la stampa di bioinchiostri di viscosità compresa tra 30 e  $6 \times 10^7$  mPa/s, rendendo possibile l'utilizzo combinato di biomateriali ad alta viscosità, utili a garantire un supporto strutturale al processo di stampa; e sia a bassa viscosità, che forniscono un ambiente consono alla sopravvivenza delle cellule. Inoltre, il bioprinting a estrusione permette di stampare tessuti caratterizzati da grande densità cellulare. Tuttavia, generalmente le cellule stampate con questo tipo di tecnica sopravvivono di meno rispetto ad altre tecniche di bioprinting, a meno che non si usino pressioni molto basse e ugelli di grandi dimensioni, che però non garantiscono un'alta risoluzione.

Questo sistema per estrusione può essere ulteriormente classificato come microestrusione continua basata su siringa o estrusione microfluidica [87]. Il primo sistema stampa bioinchiostri viscosi strato per strato ed è vantaggioso per la sua facilità d'uso e la capacità di stampare vari tipi di materiali [88]. Sebbene la microestrusione basata su siringa sia vantaggiosa, è limitata dalla risoluzione di stampa, che è di circa 100  $\mu\text{m}$  [89]. Il secondo sistema, invece, impiega camere e valvole per controllare la miscela di precursori di idrogel e agenti di reticolazione e ha un'elevata risoluzione di stampa [90]. Tuttavia, è importante sottolineare che gli approcci di estrusione microfluidica sono in gran parte limitati a bioink a bassa viscosità [91].

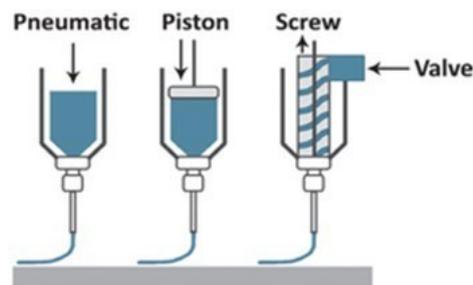


Figura 11. Rappresentazione schematica del Bioprinting a estrusione. Riprodotto con autorizzazione Copyright Nature Publishing Group, 2014

### 1.9.3 Altre modalità di bioprinting

Altre sono le tecniche di bioprinting: bioprinting a getto d'inchiostro e basato sul laser [92] (Figura 12).

Il bioprinting a getto d'inchiostro è un processo di stampa che prevede la precisa deposizione di gocce di bioink, di dimensioni variabili dal nanolitro al picolitro, sul biopaper secondo un modello digitale preciso (Figura 12a). Le dimensioni delle gocce e la risoluzione nella stampa sono determinate da vari fattori come la viscosità del bioink, la dimensione degli ugelli, la distanza tra questi ed il substrato. Il bioprinting a getto d'inchiostro offre la possibilità di stampare sia differenti tipi cellulari che biomateriali o le loro combinazioni, tramite diverse testine di stampa in un unico processo di fabbricazione, permettendo la realizzazione di costrutti multicellulari complessi. I vantaggi di questo metodo sono il basso costo, l'elevata velocità di stampa e l'alta risoluzione (50  $\mu\text{m}$ ) e poiché gli ugelli non sono a contatto col materiale stampato c'è la riduzione della possibilità di contaminazione del tessuto durante il processo. Tuttavia, le applicazioni sono limitate dal fatto che gli ugelli possono facilmente intasarsi e quindi richiedono bioinchiostri a bassa viscosità, che possono provocare stress termici e/o meccanici o danneggiare le membrane cellulari con frequenze acustiche variabili [93].

Il bioprinting basato sul laser (LAB: Laser-Assisted Bioprinting) è un'altra modalità di bioprinting e rappresenta un processo di scrittura diretta, senza contatto, che si basa sull'utilizzo di un impulso laser per trasferire singole o gruppi di cellule da una cartuccia sorgente a un substrato, senza passare per un ugello (Figura 12b). Questa tecnica permette la stampa delle cellule, con un elevato grado di precisione, all'interno di strutture 3D relativamente piccole. Poiché non necessita di ugelli, il bioprinting a laser, non ha il problema dell'ostruzione di cellule e biomateriali nel sistema di rilascio e permette inoltre di stampare inchiostri ad alta viscosità (fino a 300 mPa/s), senza influire sulla vitalità e sulla funzionalità cellulare [69]. Questa modalità può raggiungere un'elevata risoluzione di stampa ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) e un'elevata densità cellulare; tuttavia, richiede una rapida cinetica di gelificazione e velocità di flusso relativamente basse [94]. Anche questo metodo non è privo di difetti e limitazioni: il calore generato dal laser può in alcuni casi causare la morte delle

cellule contenute nel bioinchiostro e il processo di stampa, a causa anche dell'elevato grado di risoluzione, può essere molto lungo.

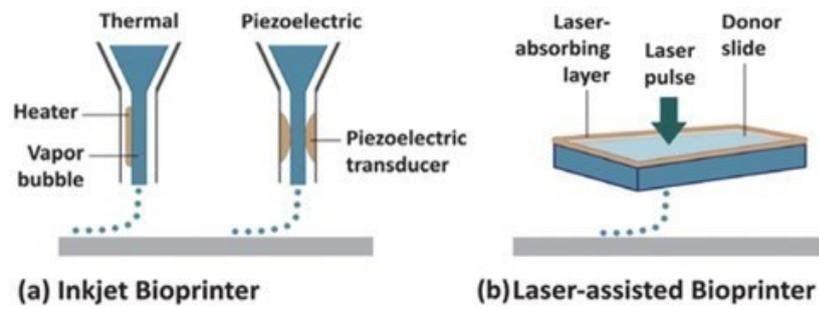


Figura 12. Rappresentazione schematica di altre tecniche di bioprinting 3D. **(a)** Bioprinting a getto d'inchiostro. **(b)** Bioprinting basato sul laser. Riprodotto con autorizzazione Copyright Nature Publishing Group, 2014.

## SCOPO DEL LAVORO

Ciò che rimane una sfida importante nel campo dell'oncologia sperimentale è la capacità di creare piattaforme che rappresentino meglio il microambiente e l'architettura del tessuto in vivo. Il comportamento e le caratteristiche delle cellule tumorali differiscono significativamente durante lo sviluppo del tumore nei sistemi in vivo rispetto alle colture in 2D, soprattutto per quanto riguarda la morfologia, la cinetica di crescita, l'espressione genica ed il grado di differenziamento.

I modelli cellulari 3D possono riprodurre il comportamento invasivo delle cellule tumorali, mimare le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare e ricreare il microambiente ideale per i meccanismi regolatori che intercorrono tra tumore e componente stromale. Grazie alla loro capacità di riprodurre le principali caratteristiche riscontrate nei tumori solidi, tali modelli sono adatti per lo screening dei composti antitumorali.

Lo scopo del lavoro presentato in questa tesi di dottorato è quello verificare le caratteristiche biologiche di modelli cellulari 3D in alcune applicazioni predittive in campo oncologico. Pertanto, qui utilizzando due diversi modelli tumorali, cancro alla prostata (linea cellulare DU145) e glioblastoma (linea cellulare U87) confrontiamo differenze fenotipiche e differenze nel tasso di risposta al trattamento tra colture 2D e 3D. In particolare, nel nostro studio, miriamo ad indagare l'effetto del dasatinib, si306 e PD1-si306 (pro-drug di si306), che sono degli inibitori di Src, in modelli di bioprinting 3D basati su matrice di alginato/gelatina rispetto ai corrispondenti modelli di sferoidi 3D e colture monostrato 2D.

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Linee cellulari

Gli esperimenti di questo lavoro di tesi sono stati eseguiti utilizzando la linea cellulare U87 (derivata da gliomi maligni di un paziente maschio, affetto da glioblastoma) e la linea cellulare DU145 (derivata da metastasi del sistema nervoso centrale di adenocarcinoma prostatico umano). Le cellule U87 sono state coltivate in terreno di crescita DMEM ad alto contenuto di glucosio e le cellule DU145 in terreno RPMI 1640. Per tutte le linee cellulari il terreno di crescita è stato integrato con 10% di siero fetale bovino, 2 mM di glutammina, 100 UI/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina. Le linee cellulari sono state fornite dall'ECACC e sono state regolarmente sottoposte a test per la ricerca di micoplasmi mediante colorazione Hoechst del DNA e PCR. Le procedure di autenticazione comprendevano la verifica della specie mediante DNA barcoding e la verifica dell'identità mediante DNA profiling. Le linee cellulari umane sono state analizzate mediante PCR delle sequenze di short tandem repeat all'interno del DNA microsatellite cromosomico (STR-PCR). Le cellule U87 e DU145 sono state inizialmente placcate a una densità di  $10^4$  cellule/cm<sup>2</sup> e incubate a 37 °C al 5% di CO<sub>2</sub>. Il numero e la vitalità delle cellule sono stati analizzati utilizzando una camera emocitometrica Neubauer e il test di esclusione del colorante tripan blu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

### 3.2 Preparazione dell'idrogel e bioprinting

L'idrogel utilizzato per il bioprinting è composto da 2% di alginato e 8% di gelatina (bioink). Le polveri sono state inizialmente esposte alla luce UV per 15 minuti e poi disciolte in DPBS sterile, sull'agitatore magnetico, a 50°C in condizioni di flusso laminare. Una volta preparato, il bioink è stato posto in siringhe sterili e conservato a 4°C fino al momento dell'uso. Prima della procedura di bioprinting, il

bioink è stato equilibrato a 37°C.  $20 \times 10^6$  cellule sono state sospese in 400  $\mu$ l di terreno di coltura e poi mescolate con 3,6 ml di bioink per raggiungere una concentrazione finale di  $5 \times 10^6$  cellule/ml. Infine, una cartuccia monouso è stata riempita con l'idrogel carico di cellule ed equilibrata a 29°C per 30 minuti in una testina di stampa a temperatura controllata. La stampa è stata eseguita con la bioprinter BIO XTM (Cellink, Göteborg, Svezia) in una piastra a 12 pozzetti, con una pressione di erogazione di 50 kPa, ad una velocità di 5 mm/s e impostando la temperatura del letto di stampa a 18°C. Le strutture 3D sono state infine reticolate con CaCl<sub>2</sub> per 10 minuti e per altri 3 minuti con BaCl<sub>2</sub> prima di aggiungere il terreno di coltura completo (DMEM per le U87 e RPMI per le DU145). Per l'estrazione delle proteine, la struttura 3D è stata rapidamente sciolta in una soluzione di EDTA 250 mM in PBS e le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 400g per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in PBS e centrifugato a 400g per 5 minuti. Il pellet risultante è stato sciolto in tampone RIPA per l'estrazione delle proteine.

### **3.3 Analisi della vitalità cellulare e dell'IC50**

Le linee cellulari DU145 e U87 sono state seminate alla densità di  $5 \times 10^4$  cellule/ml in una multiwell da 24. Dopo 24h le cellule sono state trattate con il Dasatinib, si306 e PD1 mediante il metodo delle diluzioni seriali, per 72h. Il range di concentrazioni scelto è stato compreso tra 100 $\mu$ M e 0,01 $\mu$ M. Terminate le 72h, è stato rimosso il terreno di coltura e sostituito con terreno fresco. La vitalità cellulare nelle colture 2D e 3D è stata valutata con il reagente PrestoBlue® (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), basato su una soluzione a base di resazurina pronta all'uso, non tossica e permeabile alle cellule. Tale reagente funziona come indicatore di vitalità cellulare sfruttando il potere riducente delle cellule vive e misurando quantitativamente la proliferazione cellulare. Le cellule sono state incubate con il reagente con un rapporto 1:10 per 2 ore, al buio. Successivamente è stata effettuata una lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 570 e 600 nm. Per l'analisi dell'IC50, i dati raccolti in triplicato sono stati elaborati con il software DRFit (<http://www.structuralchemistry.org/pcsb/drfit.php>).

### 3.4 Western Blot

Le linee cellulari DU145 e U87 sono state seminate in piastre da 100, ad una densità di  $2 \times 10^6$  cellule/ml e dopo 24 ore sono state trattate con 01, 1, 10 uM di Dasatinib per 24h. Le U87 sono state trattate anche con 01, 1, 10 uM di si306 e 01, 1, 10 uM di PD1-si306 (pro-drug di si306). Per l'estrazione delle proteine abbiamo inizialmente recuperato le cellule con lo scraper e successivamente il lisato cellulare è stato centrifugato per 10 minuti a 1300 g per eliminare i nuclei e i grandi detriti cellulari. Le cellule tumorali sono state poi trattate per l'estrazione delle proteine con un tampone di lisi cellulare contenente 0,1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, e integrato con 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  e 75 U di aprotinina (Sigma-Aldrich), e incubato per 20 minuti a 4°C. Il lisato cellulare è stato centrifugato per 10 minuti a 1300 g per eliminare nuclei e grossi detriti cellulari. Dopo l'analisi della concentrazione proteica mediante il saggio Bradford Dye Reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), l'intero lisato cellulare di ciascun campione è stato sottoposto a elettroforesi su gel poliacrilamidico al 10% di sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE) insieme a marcatori molecolari proteici prestagnati sharpmass VII (Euroclone, Milano, Italia). Le proteine sono state trasferite elettroforeticamente su membrane di nitrocellulosa Amersham protran 0,2 m (Cytiva Europe, Freiburg, Germania) per 90 minuti a 350 mA. Per controllare il trasferimento, il filtro è stato colorato con Rosso Ponceau (Ponceau 2%, TCA (Acido Tricloroacetico) 3%) per circa 3 minuti e decolorato con lavaggi di H<sub>2</sub>O bidistillata. Dopo il trasferimento la membrana è stata immersa in una blocking solution al 10% di latte liofilizzato (PanReacAppliChem) in TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween 20) per 1h a RT. Terminato il tempo della blocking solution, la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario (diluizione a concentrazione opportuna in latte liofilizzato all' 1% e TBS-T) a 4°C per tutta la notte. Successivamente sono stati eseguiti 2 lavaggi con TBS-T da 10 minuti ognuno. Le membrane sono state bloccate per 1h a RT con il 10% di latte non grasso in Tris Buffered Saline (Bio-Rad) a pH 7,4 contenente 20 mM Tris, 500 mM NaCl e integrato con lo 0,05% Tween 20 (Bio-Rad). 05% di Tween 20 (Bio-Rad), e testato per 1 ora a RT con anticorpi primari secondo la diluizione suggerita dal produttore: anti-src (36D10), anti-Phospho-src (Thr416) (E6G4R) e anti-GAPDH (0411) (tutti di Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Le bande proteiche sono state

visualizzate dopo 1 ora di incubazione con anti-rabbit IgG o anti-mouse IgG coniugate con perossidasi di rafano (HRP) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a temperatura ambiente e poi con reagenti di chemiluminescenza (Amersham, Buckinghamshire, UK). I segnali chemiluminescenti sono stati acquisiti con il sistema Chemidoc XRS e analizzati digitalmente per la determinazione del peso molecolare e della densità delle bande con il software Imagemol (Bio-Rad).

### **3.5 Formazione sferoidi**

Per la formazione degli sferoidi U87 e DU145 abbiamo usato il metodo “*hanging drops*”. La densità scelta è stata di  $5 \times 10^5$  cellule/ml, le quali sono state risospese in 10  $\mu$ l di terreno di crescita e 25  $\mu$ l di collagene (10ug/ml). Tale metodo prevede la deposizione di 1  $\mu$ l di cellule, sul fondo del coperchio di una piastra petri ed invertendo la piastra si forma una goccia “pendente” e le cellule, per gravità, si accumulano nel fondo della goccia, favorendo l’aggregazione cellulare in sferoidi. Gli sferoidi sono mantenuti in incubatore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo 30 min, su ogni goccia è stato aggiunto del terreno di crescita per evitare l’evaporazione della goccia stessa. Sul fondo della piastra sono stati aggiunti 8 ml di PBS, con lo scopo di mantenere alto il livello di umidità. Dopo 24h gli sferoidi formati sono stati trasferiti in una multiwell da 96 pozzetti a fondo tondo con 200 $\mu$ l di terreno di crescita DMEM per le U87 e RPMI per le DU145.

### **3.6 Analisi della vitalità degli sferoidi**

Sugli sferoidi è stato fatto un test di proliferazione e vitalità. Dopo che sono stati trasferiti nella multiwell da 96 pozzetti a fondo tondo, la vitalità cellulare degli sferoidi è stata valutata mediante il colorante vitale PrestoBlue® (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), in un rapporto 1:10. Il colorante vitale una volta aggiunto in ogni pozzetto, è stato lasciato per 2h al buio, in incubatore. Trascorse le 2h, è stata fatta una lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d’onda di 570 e 600nm. Successivamente gli sferoidi sono stati trattati con il dasatinib (sferoidi U87 e

DU145) e con si306 e PD1-si306 (sferoidi U87), mediante il metodo delle diluizioni seriali, per 72h. Il range di concentrazioni scelto è stato compreso tra 100 $\mu$ M e 0,01 $\mu$ M. Terminate le 72h è stata nuovamente valutata la vitalità mediante il PrestoBlue®. I dati (in triplicato) sono stati analizzati e utilizzando il programma Dr Fit, sono state ottenute le curve IC50.

### **3.7 Saggio di migrazione cellulare**

Per il saggio di migrazione le cellule sono state prima seminate ad una densità di 5x10<sup>5</sup> cellule/ml in una multiwell da 6 pozzetti e il giorno dopo, le DU145 e le U87, sono state trattate con il dasatinib ad una concentrazione di 10  $\mu$ M. Le U87 sono state trattate anche con 01, 1, 10  $\mu$ M di si306 e 01, 1, 10  $\mu$ M di PD1-si306. Dopo 24h, le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura mediante la tripsina-EDTA e centrifugate a 300 g per 10 min. Successivamente sono state prima contate mediante il contacellule e poi riseminate ad una densità di 3x10<sup>4</sup> cellule/ml sulla parte superiore della membrana filtrante di inserti (greiner bio-one pore 3.0  $\mu$ m trasparente PET membrane) che sono stati inseriti nella multiwell da 24 pozzetti. Nei pozzetti sono stati aggiunti 800  $\mu$ l di terreno di crescita completo (DMEM per le U87 e RPMI per le DU145), che funge da chemoattraente per la presenza del siero, le cellule, invece, sono state risospese in terreno senza siero. Il tempo di incubazione previsto è stato di 2h, in cui le cellule sono state ritratte. Dopo questo periodo di incubazione è stato rimosso l'inserto dalla piastra multiwell, il quale è stato pulito dalle cellule rimanenti che non sono migrate dalla parte superiore della membrana. Sono stati poi aggiunti 200  $\mu$ l di formalina filtrata in ogni inserto, per 10 min a temperatura ambiente, in modo tale da consentire la fissazione delle cellule. Successivamente sono stati aggiunti 200  $\mu$ l di Cristal violetto (12mM in una soluzione al 20% di metanolo in acqua) in ogni inserto per 10 min a temperatura ambiente. Il Cristal violetto è stato poi rimosso e sono stati eseguiti dei lavaggi con acqua di fonte per rimuovere l'eccesso di colorante. Le cellule sono state contate mediante il microscopio per ottenere una media delle cellule che sono migrate attraverso la membrana.

### **3.8 Saggio di disseminazione degli sferoidi**

Sugli sferoidi è stato eseguito un saggio di disseminazione sulla matrice di collagene. I pozzetti della multiwell sono stati rivestiti con 30  $\mu$ l di collagene (4 mg/ml) 24h prima del trasferimento degli sferoidi. Una volta trasferiti sono stati trattati con il dasatinib ad una concentrazione di 10  $\mu$ M (sferoidi U87 e DU145) e con si306 e PD1-si306 ad una concentrazione di 5  $\mu$ M (sferoidi U87). Successivamente sono stati monitorati fino a 24h mediante microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100  $\times$ ) scattando immagini digitali nei tempi stabiliti. I tempi scelti sono stati T0 (sferoide appena trasferito), T8 e T24. Le immagini sono state analizzate dal software di dominio pubblico ImageJ (<https://imagej.nih.gov>) per la valutazione semiquantitativa della zona invasa.

## RISULTATI

### *4.1 Crescita delle cellule tumorali nell'impalcatura biostampata.*

Le cellule del cancro alla prostata (DU145) e del glioblastoma (U87) sono state risospese in idrogel di alginato/gelatina a una densità di  $5 \times 10^6$  cellule/mL. La sospensione cellulare è stata biostampata in un ambiente controllato su ciascun pozzetto di una piastra da 12 pozzetti seguendo il modello digitale di una forma cuboide con quattro spazi vuoti interni (dimensioni della struttura: L 12 mm  $\times$  W 12 mm  $\times$  H 1, 2 mm) (Figura 1a). La crescita delle cellule tumorali è stata monitorata dal reagente di vitalità cellulare PrestoBlue® e ha rivelato un progressivo aumento del numero di cellule vitali simile nelle due linee cellulari, con un tempo di raddoppio di circa 14 giorni (Figura 1b). Quando le strutture biostampate sono state osservate mediante microscopia a contrasto di fase, era evidente che le cellule tumorali tendevano a formare aggregati sferoidi con diametro crescente nel tempo (Figura 1c).

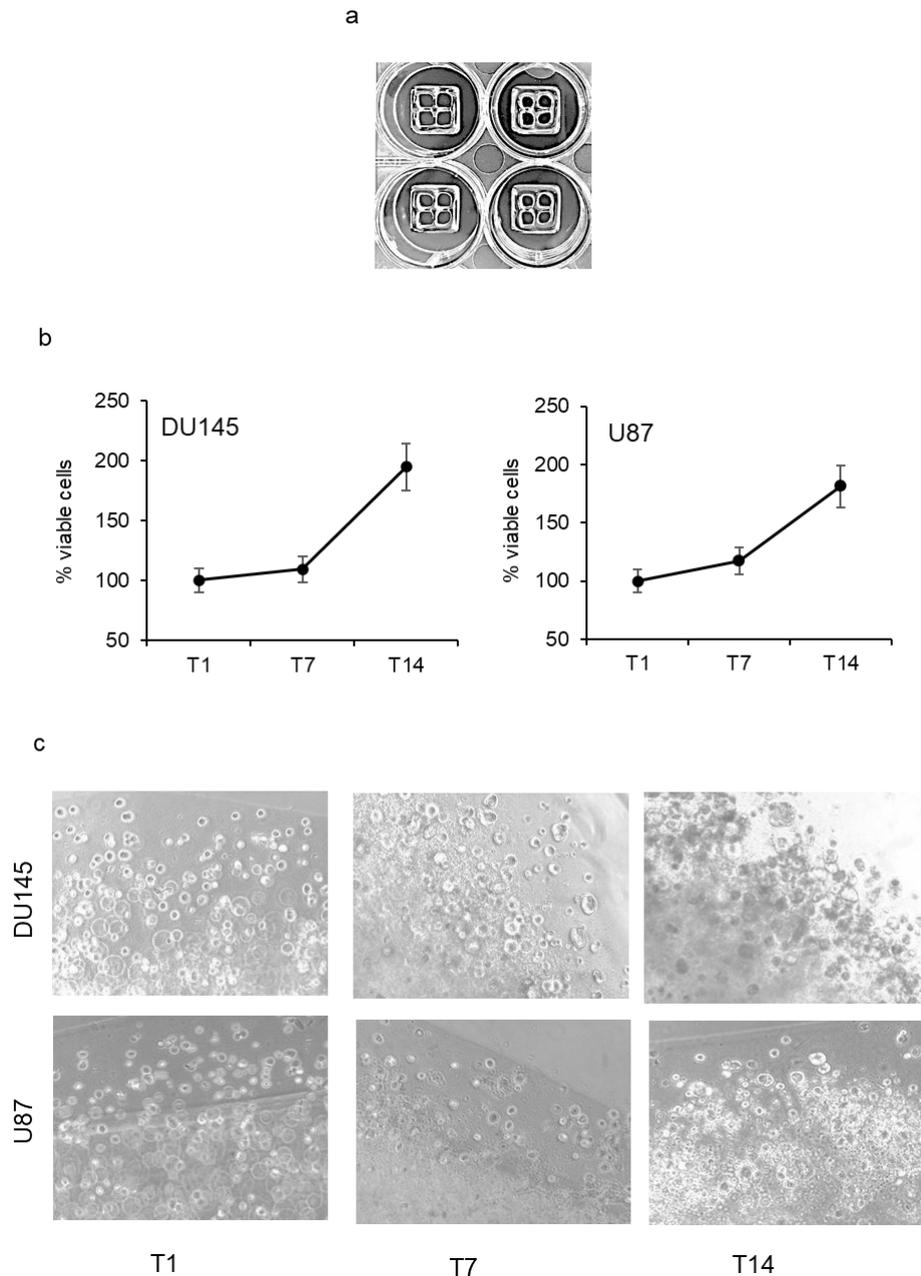


Figura 1. Crescita delle cellule tumorali nell'impalcatura biostampata. (a) Immagine esemplificativa di costrutti di alginato/gelatina biostampati in una multiwell a 12 pozzetti. (b) Percentuale media di cellule DU145 e U87 vitali coltivate in impalcature biostampate e valutate 1, 7 e 14 giorni (T1, T7, T14) dopo la biostampa. I valori medi misurati a T1 sono stati aggiustati al 100%. Ogni valore rappresenta la media di cinque diversi bioprint ( $\pm$ deviazione standard). (c) Immagini rappresentative acquisite mediante microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100  $\times$ ) di bioprint contenenti DU145 (immagini superiori) e cellule U87 nei giorni 1, 7 e 14 dopo la stampa.

#### ***4.2 Effetto antiproliferativo di dasatinib, si306 e PD1 nei modelli cellulari 2D e 3D.***

Le cellule tumorali DU145 e U87 sono state sottoposte a concentrazioni crescenti di dasatinib (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) per 72 ore e la crescita del tumore è stata monitorata dal reagente di vitalità cellulare PrestoBlue® (Figura 2a). Il dasatinib ha determinato una significativa riduzione della vitalità cellulare in maniera più evidente per le DU145, rispetto alle U87. Le cellule U87 sono state trattate anche con concentrazioni crescenti di si306 e PD1 (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 2b). I composti in questione hanno determinato una significativa riduzione della vitalità cellulare, con tendenze simili.

Anche le cellule tumorali biostampate e gli sferoidi tumorali, utilizzando sia le DU145 che le U87, sono state sottoposte a concentrazioni crescenti di dasatinib (1, 10, e 100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 3a, b). La citotossicità di dasatinib era più marcata nelle U87 rispetto alle DU145. Inoltre, secondo il valore IC50, le cellule biostampate hanno dimostrato una maggiore sensibilità al dasatinib rispetto agli sferoidi, ma sia gli sferoidi che i bioprint erano molto meno suscettibili all'azione del dasatinib rispetto alla coltura cellulare 2D trattata nelle stesse condizioni sperimentali.

Le cellule tumorali biostampate e gli sferoidi tumorali, utilizzando le cellule U87 sono state sottoposte anche a concentrazioni crescenti di si306 e PD1 (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) (Figura 4a, b). Si306 e PD1 hanno determinato una significativa riduzione della vitalità cellulare in maniera simile. Gli sferoidi, trattati con entrambi i composti, hanno dimostrato una maggiore sensibilità rispetto alle cellule biostampate.

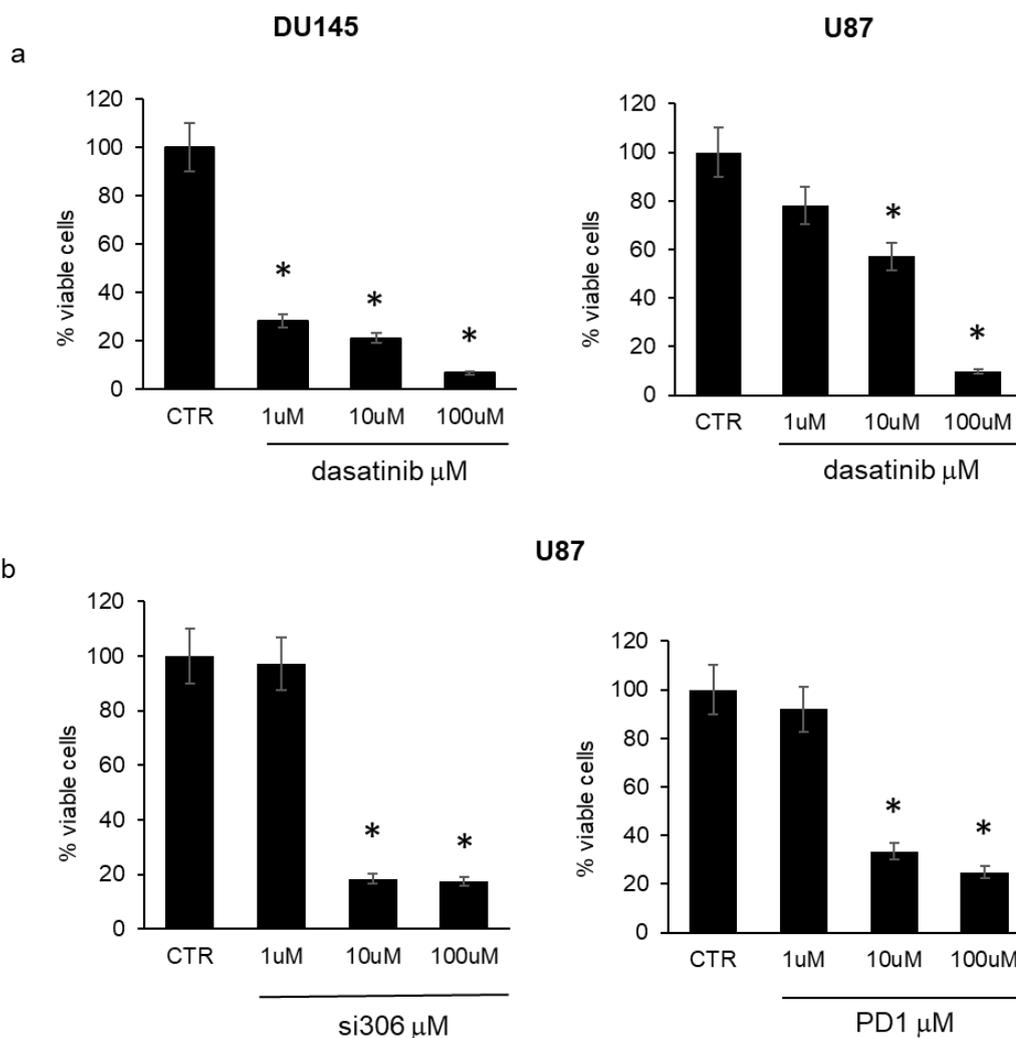
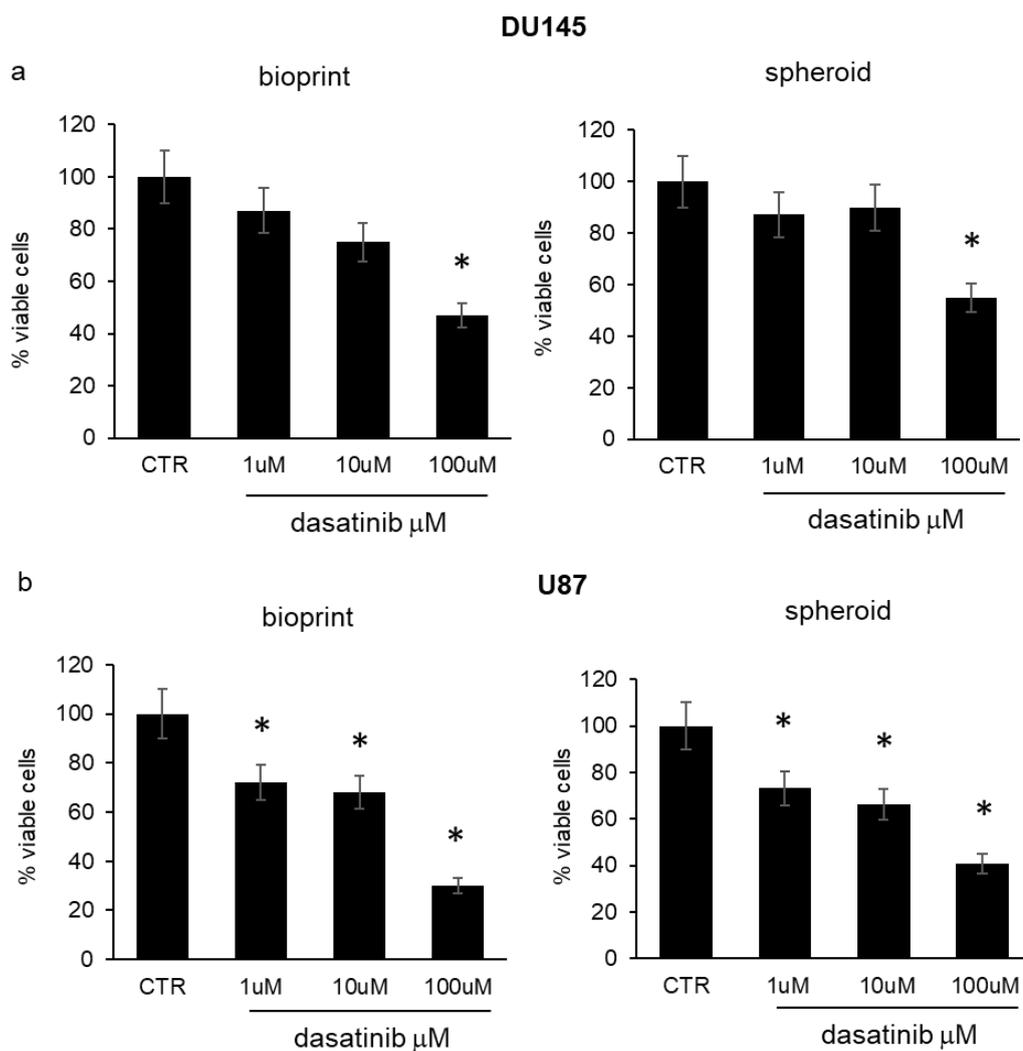
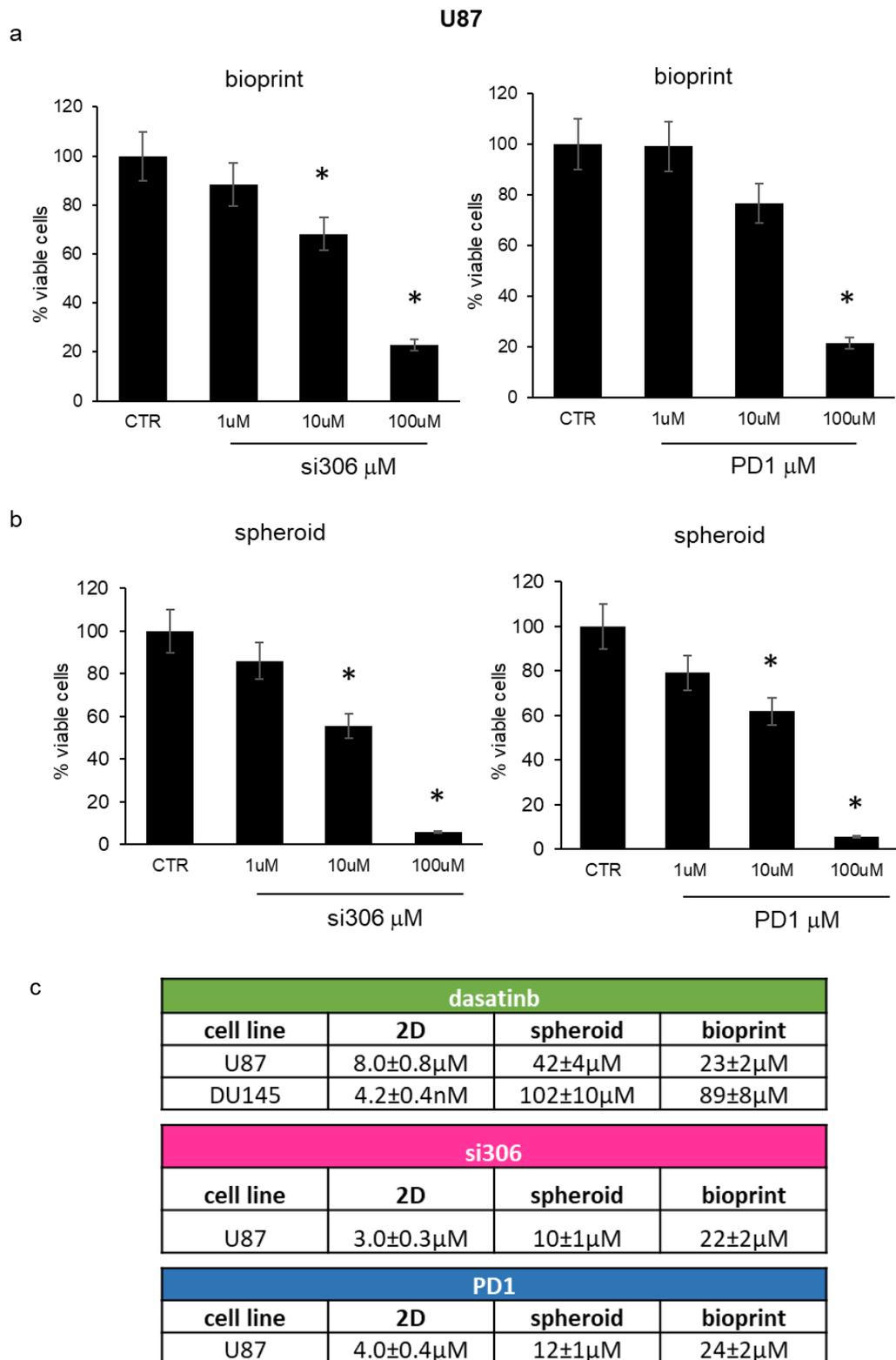


Figura 2. Effetto antiproliferativo di dasatinib, si306 e PD1 nei modelli cellulari 2D. (a) Percentuale di cellule DU145 vitali (a sinistra) e delle cellule U87 vitali (a destra) 72 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti di dasatinib (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. (b) Percentuale di cellule U87 vitali 72 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti di si306 (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) (a sinistra) e PD1 (a destra). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. Ciascun valore rappresenta la media di cinque diverse misurazioni ( $\pm$ deviazione standard).



*Figura 3. Effetto antiproliferativo di dasatinib in modelli cellulari 3D. (a) Percentuale di cellule vitali di DU145 in bioprint (a sinistra) e in sferoidi (a destra) 72 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti di dasatinib (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. (b) Percentuale di cellule U87 vitali in bioprint (a sinistra) e in sferoidi (a destra) 72 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti di dasatinib (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. Ciascun valore rappresenta la media di cinque diverse misurazioni ( $\pm$ deviazione standard).*



*Figura 4. Effetto antiproliferativo di si306 e PD1 in modelli cellulari 3D. (a) Percentuale di cellule vitali di U87 in bioprint 72 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti di si306 (1, 10 e 100  $\mu$ M) (a sinistra) e PD1 (a destra) I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. (b) Percentuale di cellule U87 vitali in sferoidi*

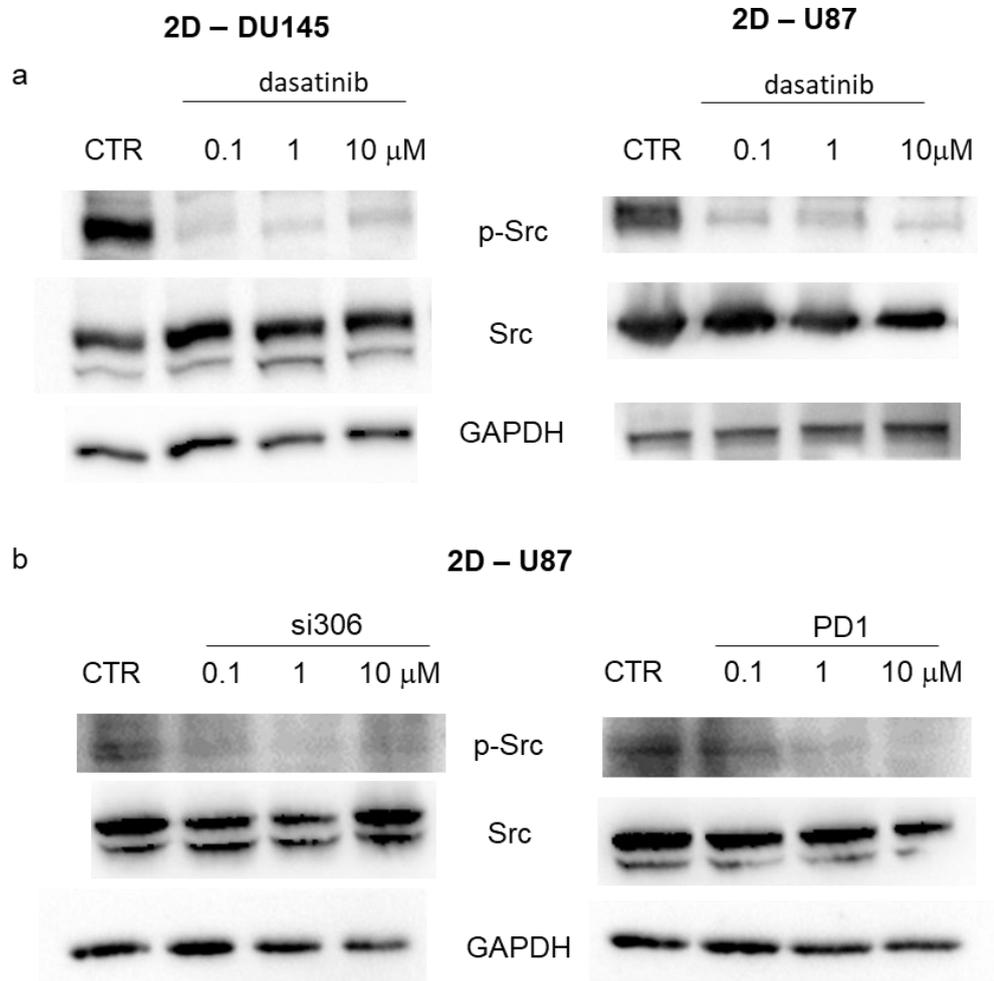
72 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti di si306 (1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) (a sinistra) e PD1 (a destra). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. (c) Valori medi di IC50 calcolati per le cellule U87 e DU145 trattate con dasatinib, si306 e PD1 per 72 ore. Le IC50 sono state calcolate in condizioni di coltura standard (2D), in un modello di bioprint 3D e in sferoidi e sono il risultato di tre diversi esperimenti (deviazione standard).

### **4.3 Valutazione dell'attivazione di Src.**

L'espressione di Src e della sua forma attiva, pSrc (Tyr416), è stata valutata in coltura 2D e in strutture biostampate, realizzate con cellule DU145 e U87. I livelli di espressione di Src totale, pSrc (Tyr416) e GAPDH sono stati valutati nei lisati cellulari totali mediante analisi Western blot in colture cellulari 2D trattate con concentrazioni crescenti di dasatinib (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) per 24 ore. In entrambe le linee cellulari, una riduzione nella forma attiva di Src, ma non nella Src totale, era già evidente da 0,1  $\mu\text{M}$  di dasatinib (Figura 5a). I livelli di espressione di Src totale, pSrc (Tyr416) e GAPDH sono stati valutati anche nei lisati cellulari delle U87 trattate con concentrazioni crescenti di si306 e PD1 (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) per 24 ore. Entrambi i composti hanno determinato una riduzione nella forma attiva di Src a partire da 0,1  $\mu\text{M}$  (Figura 5b).

L'analisi Western blot ha permesso anche di valutare i livelli di espressione di Src totale, pSrc (Tyr416) e GAPDH nei lisati cellulari totali in modelli cellulari tridimensionali (bioprinting e sferoidi). I risultati delle strutture biostampate, trattate con 10 e 25  $\mu\text{M}$  di dasatinib per 24 ore, non hanno mostrato una riduzione apprezzabile della forma attiva di Src nel modello DU145, mentre la prima concentrazione effettiva di dasatinib nelle cellule U87 era di 25  $\mu\text{M}$  (Figura 6a). Le strutture biostampate U87 sono state trattate anche con 10 e 25  $\mu\text{M}$  di si306 e PD1 per 24 ore. I risultati, per entrambi i composti, hanno mostrato una riduzione della forma attiva di Src a 25  $\mu\text{M}$  (Figura 6b). Anche gli sferoidi DU145 trattati con 10 e 25  $\mu\text{M}$  di dasatinib non hanno mostrato una riduzione della forma attiva di Src, mentre, gli sferoidi U87 a 25  $\mu\text{M}$  di dasatinib hanno mostrato un'evidente riduzione (Figura 7a). Invece, gli sferoidi U87 trattati con 10 e 25  $\mu\text{M}$  di si306 e PD1 hanno

mostato una riduzione già a 10  $\mu\text{M}$  per entrambi i composti in questione (Figura 7b).



*Figura 5. Valutazione dell'attivazione di Src nel modello cellulare 2D. (a) Analisi Western blot dei lisati cellulari totali da cellule DU145 (a sinistra) e U87 (a destra) coltivate in condizioni standard (2D). I lisati cellulari sono stati recuperati 24 ore dopo il trattamento con dasatinib con concentrazioni crescenti (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) e analizzati per l'espressione di pSrc (Tyr416), Src totale e GAPDH (riferimento di caricamento). (B) Analisi Western blot dei lisati cellulari totali da cellule U87 coltivate in condizioni standard (2D). I lisati cellulari sono stati recuperati 24 ore dopo il trattamento con concentrazioni crescenti (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ) di si306 (a sinistra) e PD1 (a destra) e analizzati per l'espressione di pSrc (Tyr416), Src totale e GAPDH (riferimento di caricamento).*

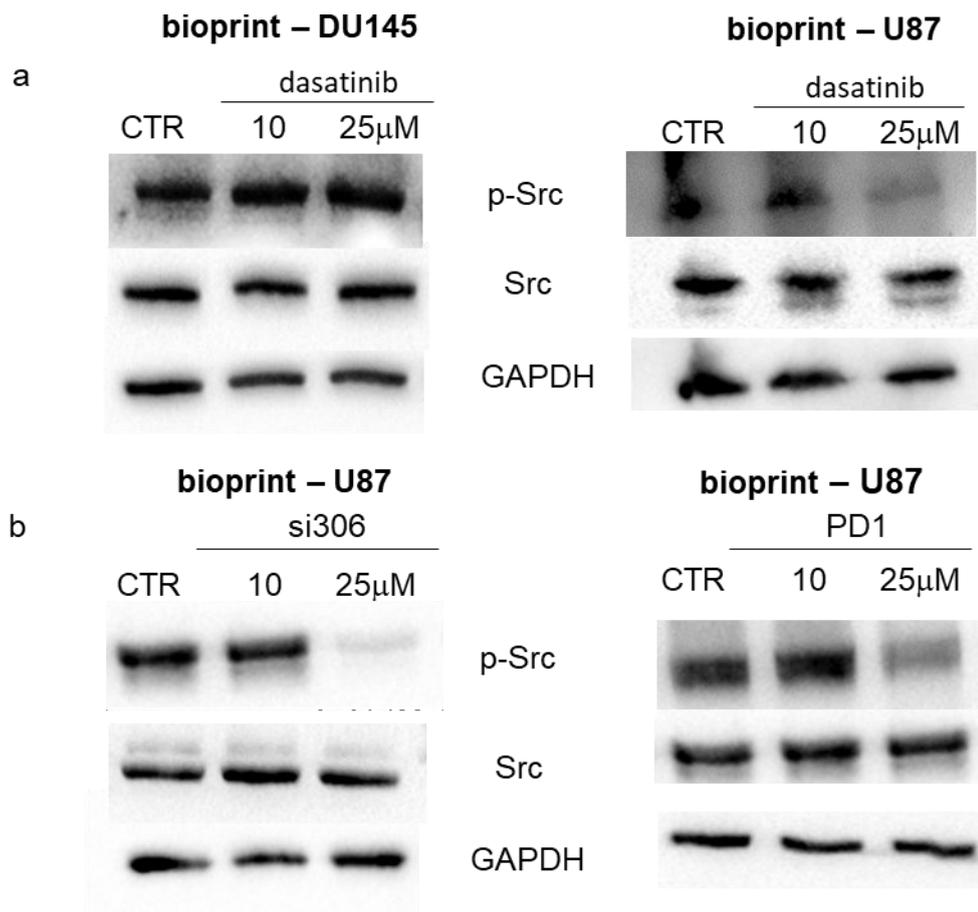
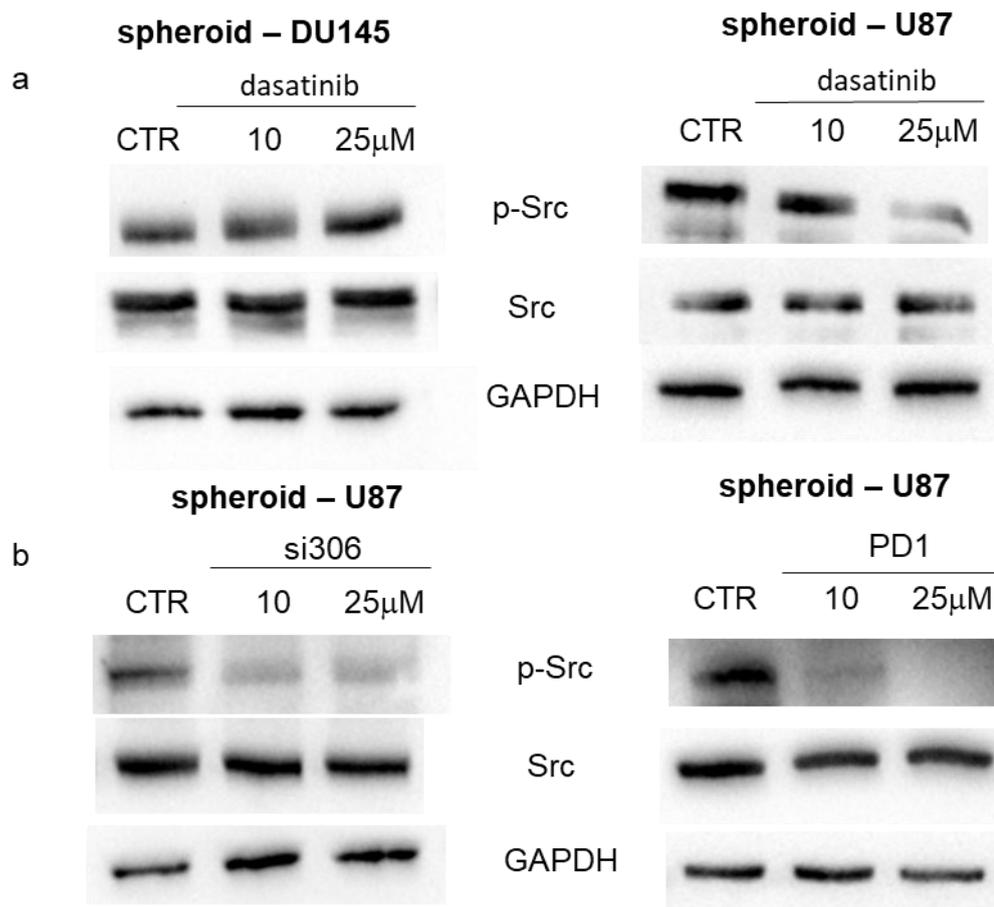


Figura 6. Valutazione dell'attivazione di Src nel modello bioprinting 3D. (a) Analisi Western blot dei lisati cellulari totali da cellule DU145 (a sinistra) e U87 (a destra) in coltura nell'impalcatura biostampata con alginato/gelatina (bioprint). Le strutture sono state trattate per 24 ore con 10 e 25  $\mu\text{M}$  di dasatinib e analizzate per l'espressione di pSrc (Tyr416), Src totale e GAPDH (riferimento di caricamento). (b) Analisi Western blot dei lisati cellulari totali da cellule U87 (bioprint). Le strutture sono state trattate per 24 ore con 10 e 25  $\mu\text{M}$  di dasatinib (a sinistra) e PD1 (a destra) e analizzate per l'espressione di pSrc (Tyr416), Src totale e GAPDH (riferimento di caricamento).



*Figura 7. Valutazione dell'attivazione di Src nel modello degli sferoidi 3D. (a) Analisi Western blot dei lisati cellulari totali da cellule DU145 (a sinistra) e U87 (a destra) (spheroid). Gli sferoidi sono stati trattati per 24 ore con 10 e 25  $\mu$ M di dasatinib e analizzati per l'espressione di pSrc (Tyr416), Src totale e GAPDH (riferimento di caricamento). (b) Analisi Western blot dei lisati cellulari totali da cellule U87 (spheroid). Gli sferoidi sono stati trattati per 24 ore con 10 e 25  $\mu$ M di si306 (a sinistra) e PD1 (a destra) e analizzate per l'espressione di pSrc (Tyr416), Src totale e GAPDH (riferimento di caricamento).*

#### **4.4 Inibizione della migrazione cellulare da parte di dasatinib, si306 e PD1.**

I modelli di coltura cellulare 2D e bioprint 3D sono stati trattati per 24 ore con concentrazioni crescenti di dasatinib, si306 e PD1 (0,1, 1 e 10  $\mu$ M), successivamente le cellule sono state recuperate per valutare la loro capacità di migrazione. L'analisi del numero di cellule in grado di attraversare la membrana del

sistema transwell ha dimostrato che nelle cellule DU145 e U87 trattate in condizioni di coltura standard, il dasatinib era efficace nel ridurre la migrazione cellulare a una concentrazione di 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ , rispettivamente (Figura 8a). Al contrario, le cellule recuperate dal bioprint non hanno mostrato una significativa riduzione della migrazione cellulare rispetto alle cellule di controllo per le cellule DU145, e solo alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  per le cellule U87 (Figura 9a).

Nelle cellule U87 trattate in condizioni di coltura standard, si306 e PD1 erano efficaci nel ridurre la migrazione cellulare a una concentrazione di 0,1  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ , rispettivamente (Figura 8b). Al contrario, le cellule recuperate dal bioprint hanno mostrato una riduzione della migrazione cellulare solo alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$  (Figura 9b)

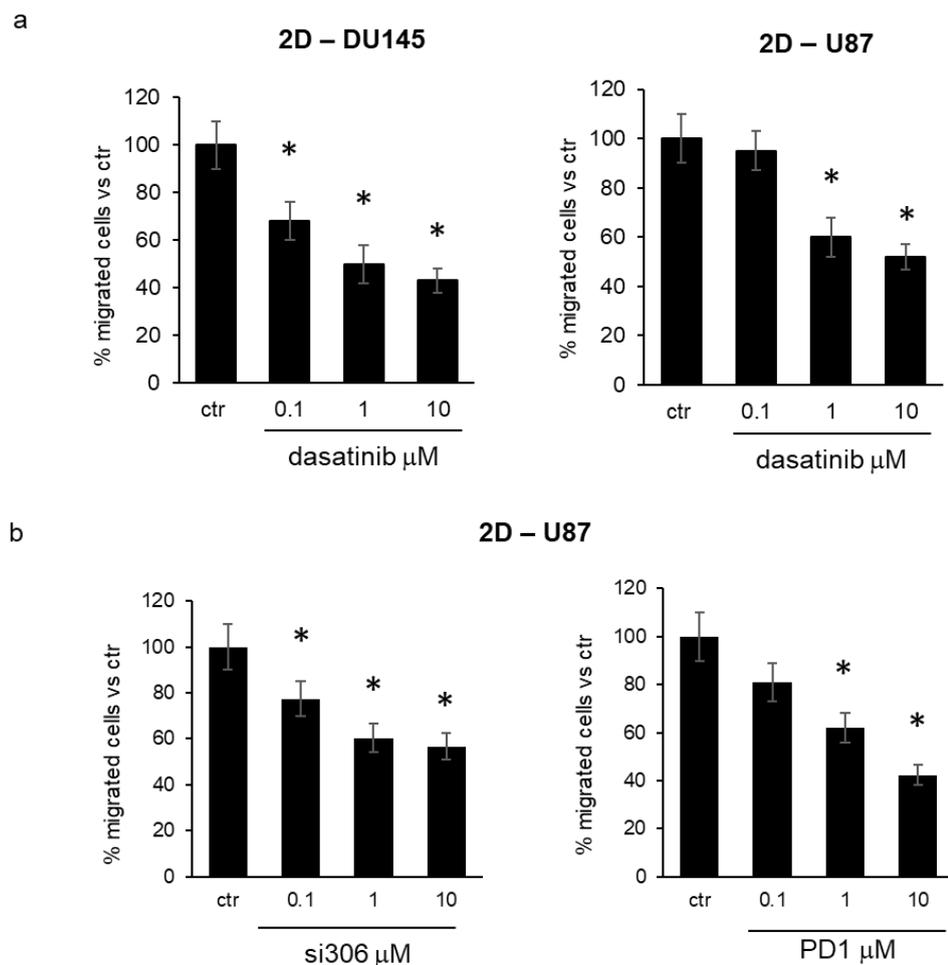


Figura 8. Inibizione della migrazione cellulare da parte di dasatinib, si306 e PD1 nel modello cellulare 2D (a) Percentuale di cellule DU145 (a sinistra) e U87 (a destra)

migrate valutate nel sistema transwell utilizzando cellule da coltura cellulare standard 2D trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti di dasatinib (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. (b) Percentuale di cellule U87 migrate valutate nel sistema transwell utilizzando cellule da coltura cellulare standard 2D e trattati per 24 ore con concentrazioni crescenti di si306 (a sinistra) e PD1 (a destra) (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. Ciascun valore rappresenta la media di cinque diverse misurazioni ( $\pm$ deviazione standard). \*  $p < 0,01$  rispetto a ctr, secondo il test t di Student.

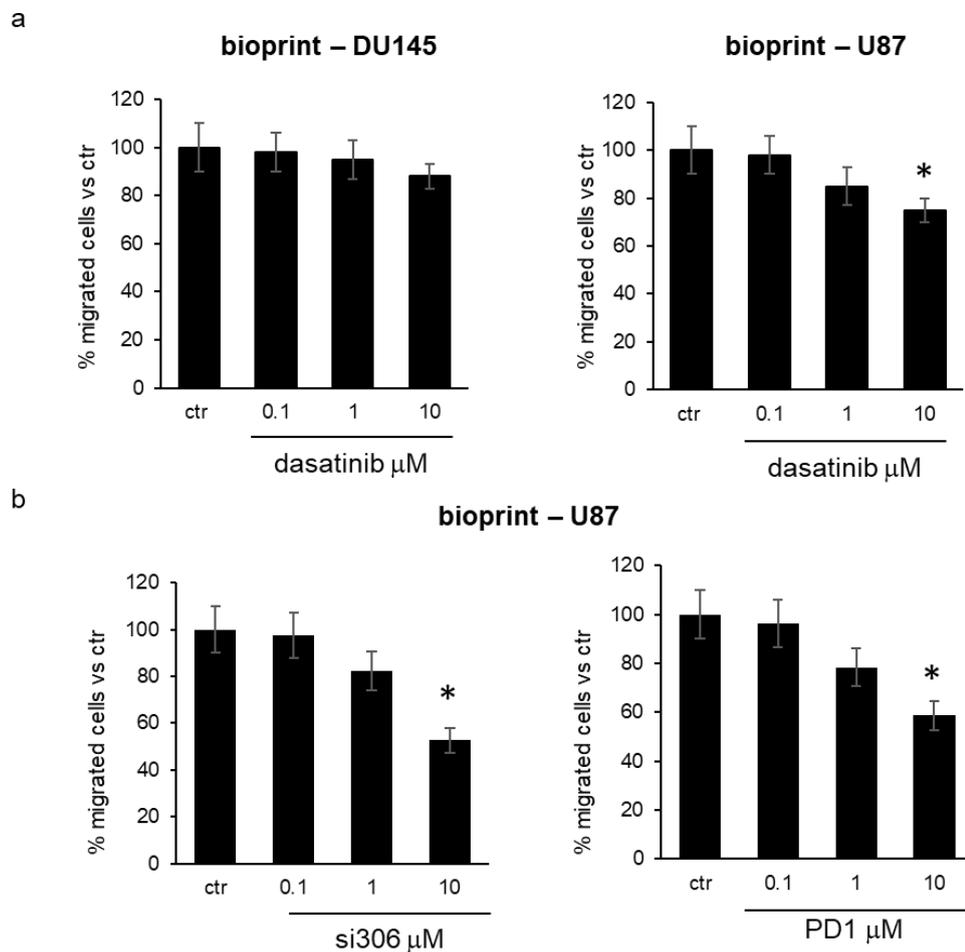
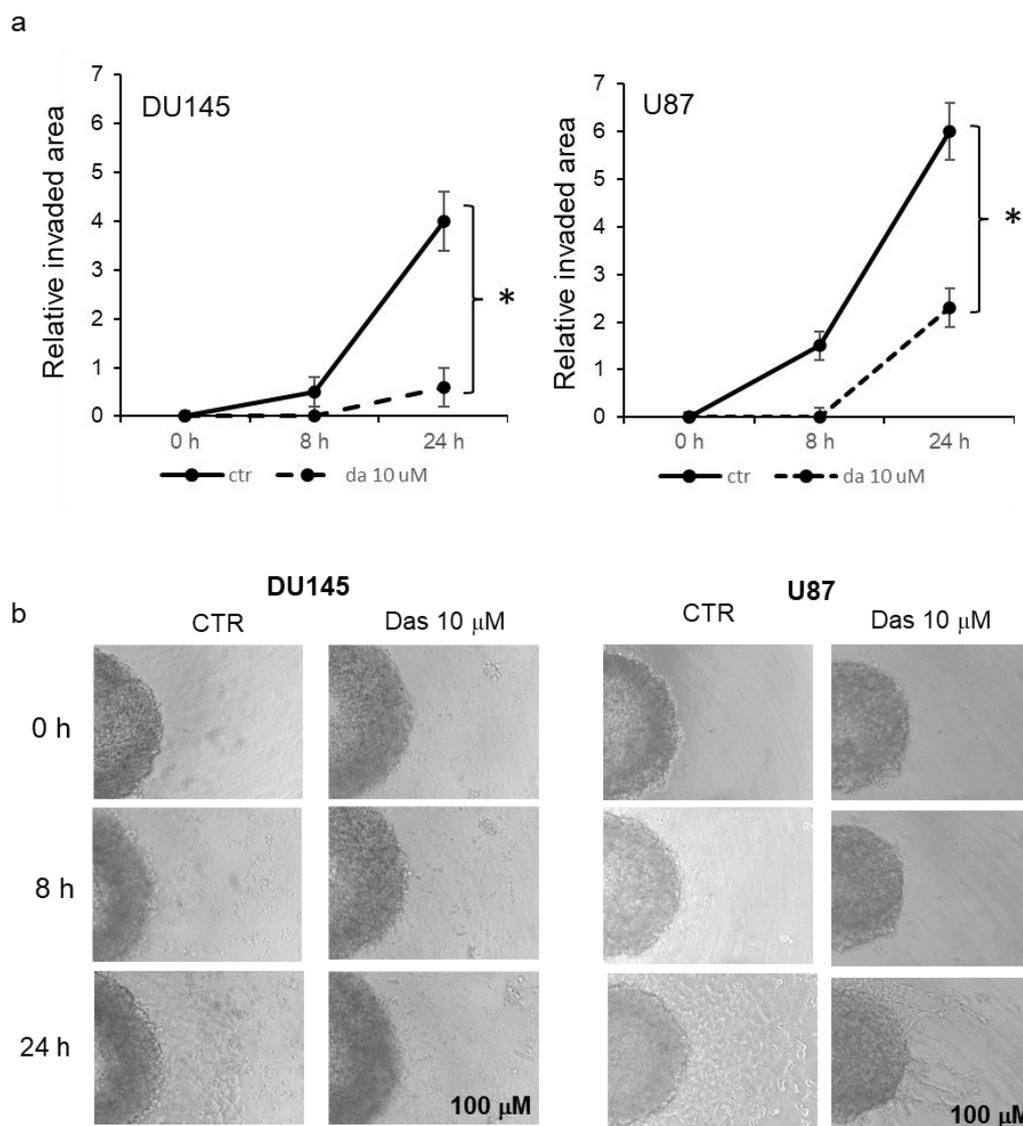


Figura 9. Inibizione della migrazione cellulare da parte di dasatinib, si306 e PD1 nel modello bioprinting 3D. (a) Percentuale di cellule DU145 (a sinistra) e U87 (a destra) migrate valutate nel sistema transwell utilizzando cellule dal modello bioprint e trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti di si306 (0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. (c) Percentuale di cellule U87

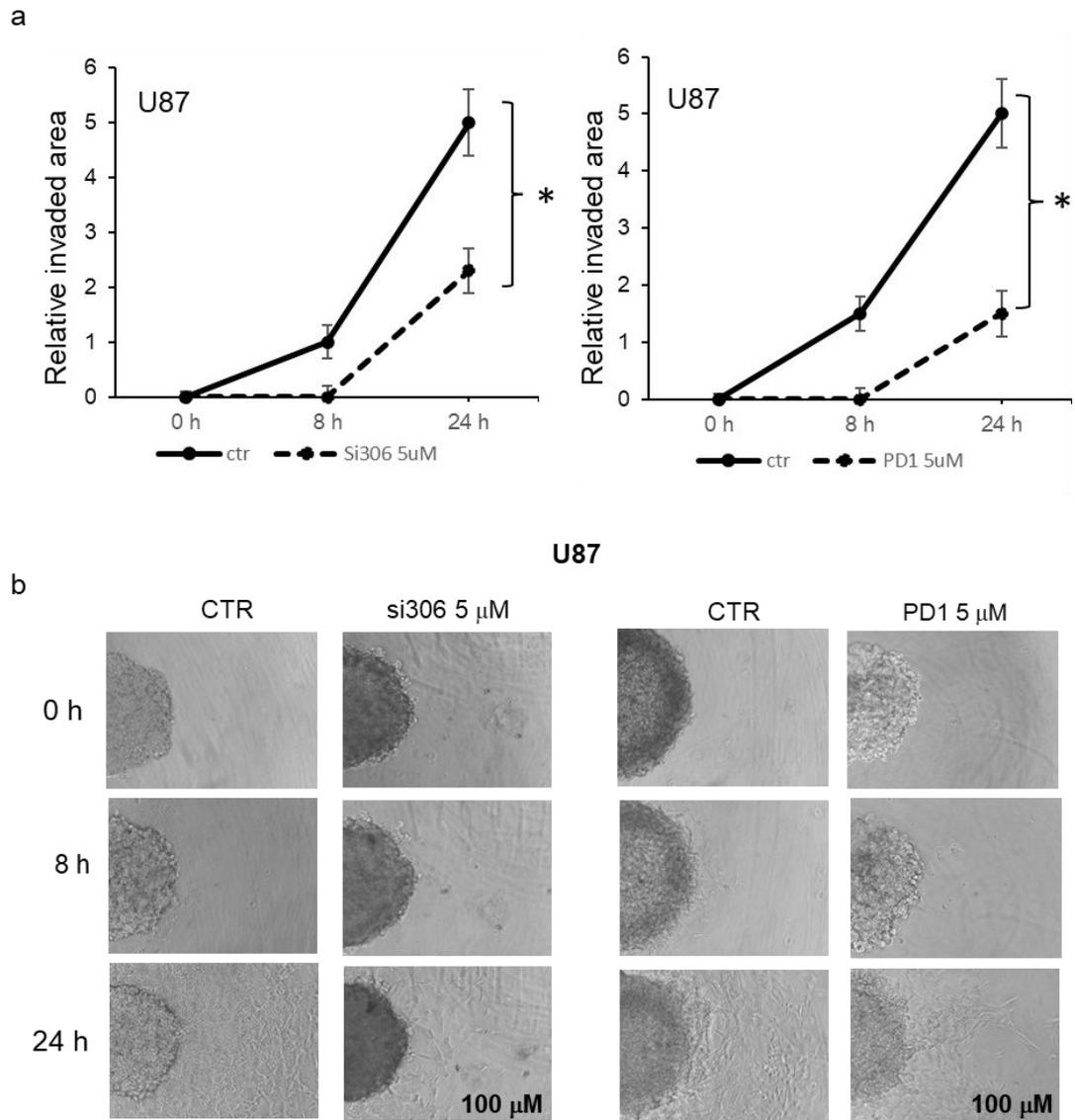
*migrate valutate nel sistema transwell utilizzando cellule dal modello bioprint e trattate per 24 ore con concentrazioni crescenti di si306 (a destra) e PD1 (a sinistra) (0,1, 1 e 10  $\mu$ M). I valori medi misurati nelle cellule non trattate sono stati aggiustati al 100%. Ciascun valore rappresenta la media di cinque diverse misurazioni ( $\pm$ deviazione standard). \*  $p < 0,01$  rispetto a ctr, secondo il test t di Student.*

#### ***4.5 Inibizione della disseminazione cellulare negli sferoidi.***

Al fine di verificare l'effetto di dasatinib sulla migrazione delle cellule cresciute in sferoidi, le cellule DU145 e U87 sono state utilizzate per formare sferoidi per 48 ore e quindi gli sferoidi sono stati trasferiti su piastre rivestite di collagene, dove metà di essi sono stati trattati con 10  $\mu$ M di dasatinib, 5  $\mu$ M di si306 e 5  $\mu$ M di PD1. Quindi, gli sferoidi sono stati monitorati mediante microscopia a contrasto di fase e sono state acquisite immagini digitali del corso del tempo. La valutazione della disseminazione è stata effettuata misurando l'area occupata dalle cellule adese al collagene, sottraendo l'area dello sferoide. L'analisi dei valori medi relativi dell'area coperta ha rivelato che le cellule negli sferoidi di controllo erano in grado di disseminare progressivamente sul collagene dalla superficie dello sferoide, e questo fenomeno era significativamente evidente a partire da 8 ore dopo la placcatura cellulare (Figura 10 e 11 a, b). D'altra parte, lo sferoide trattato con dasatinib, si306 e PD1 ha dimostrato una ridotta capacità di disseminazione e un aumento significativo dell'area disseminata media era visibile solo dopo 24 ore ma in misura minore rispetto all'area media di controllo.



*Figura 10. Inibizione della disseminazione cellulare nello sferoide. (a) Area media relativa invasa negli sferoidi DU145 e U87 valutata 8 e 24 ore dopo la placcatura sulla superficie rivestita di collagene. Le immagini sono state analizzate dal software ImageJ (<https://imagej.nih.gov>). I valori rappresentano la media di cinque diverse misurazioni ( $\pm$ deviazione standard) di sferoidi trattati con dasatinib 10  $\mu$ M, rispetto alla condizione di ctr. \*  $p < 0,01$  tra i punti indicati secondo il test t di Student. (b) Immagini rappresentative acquisite mediante microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100  $\times$ ) di cellule DU145 e U87 a 0, 8 e 24 ore dopo la placcatura in presenza e in assenza di 10  $\mu$ M di dasatinib.*



*Figura 11. Inibizione della disseminazione cellulare nello sferoide. (a) Area media relativa invasa negli sferoidi U87 valutata 8 e 24 ore dopo la placcatura sulla superficie rivestita di collagene. Le immagini sono state analizzate dal software ImageJ (<https://imagej.nih.gov>). I valori rappresentano la media di cinque diverse misurazioni ( $\pm$ deviazione standard) di sferoidi trattati con 5  $\mu$ M di si306 (a sinistra) e PD1 (a destra), rispetto alla condizione di ctr. \*  $p < 0,01$  tra i punti indicati secondo il test t di Student. (b) Immagini rappresentative acquisite mediante microscopia a contrasto di fase (ingrandimento 100  $\times$ ) di cellule U87 a 0, 8 e 24 ore dopo la placcatura in presenza e in assenza di 5  $\mu$ M di si306 (a sinistra) e PD1 (a destra).*

## DISCUSSIONE

Le colture di tessuto 3D tumorali rappresentano un modello sperimentale in grado di imitare potenzialmente la crescita in vivo. In particolare, mostrano caratteristiche distinte in termini di fenotipo cellulare, trasporto di massa e interazioni cellula-cellula rispetto alle colture cellulari 2D [47]. Queste caratteristiche possono influenzare in modo significativo la sensibilità ai farmaci antitumorali ed è per questo motivo che è fondamentale acquisire conoscenze dettagliate sulla loro risposta, al fine di pianificare il loro effettivo utilizzo nella sperimentazione preclinica dei farmaci.

Gli sferoidi sono considerati un modello ideale per imitare alcune importanti caratteristiche del tumore, come l'organizzazione strutturale e i gradienti di ossigeno, pH e nutrienti [95]. In effetti, gli sferoidi tumorali sono stati spesso considerati negli studi preclinici per valutare la risposta alla chemioterapia. Nonostante siano state testate diverse tecniche per la formazione degli sferoidi, rimangono ancora diversi problemi per l'esecuzione di questo modello a livello preclinico, in particolare per la riproducibilità e l'applicazione ad alto rendimento [96].

Recentemente, la biostampa 3D è stata riconosciuta come una tecnologia promettente per la creazione di una piattaforma basata su tessuti con un controllo preciso e un'elevata riproducibilità. Affinché un modello bioprinting 3D sia utilizzato nelle applicazioni farmaceutiche, è necessario che venga scelto un biomateriale stampabile appropriato (bioink), in maniera tale da poter determinare i fenotipi delle cellule tumorali e le proprietà biofisiche del tessuto. Inoltre, i polimeri utilizzati nel bioink promuovono interazioni cellulari, aumento della proliferazione cellulare, motilità e differenziazione cellulare [97]. Tra i polimeri naturali, l'alginato di sodio svolge un ruolo significativo nelle applicazioni di ingegneria dei tessuti grazie alla sua biocompatibilità, biodisponibilità, basso costo e alle sue proprietà tissotropiche. La combinazione di alginato di sodio e gelatina fornisce un eccellente idrogel da utilizzare come substrato nella tecnologia di stampa 3D. La gelatina è frequente aggiunta all'alginato per migliorare la citocompatibilità e la stampabilità.

Nel nostro studio, abbiamo confermato che le cellule DU145 e U87 sopravvivono nell'impalcatura di alginato/gelatina, mostrando un trend di proliferazione per almeno 14 giorni. Le cellule tumorali coltivate in queste condizioni tendevano a crescere come cellule aggregate, simili a sferoidi e questo perché il bioink non rappresenta un substrato adesivo per le cellule. Quando abbiamo confrontato la coltura tissutale biostampata 3D con la coltura 2D e gli sferoidi nella loro suscettibilità al trattamento con dasatinib abbiamo accertato che le cellule biostampate 3D si comportavano in modo più simile al modello sferoidale. Infatti, sia le cellule biostampate che gli sferoidi, hanno dimostrato una maggiore resistenza alla tossicità del composto rispetto alla coltura cellulare 2D. La resistenza era particolarmente evidente nelle cellule DU145 e leggermente superiore negli sferoidi rispetto alle colture di tessuti biostampati. Anche il trattamento con gli inibitori pirazolo [3,4-d] pirimidinici si306 e PD1 ha dimostrato che le cellule coltivate mediante il modello bioprinting 3D erano notevolmente più resistenti alla tossicità dei farmaci, rispetto alle corrispondenti cellule coltivate in monostrato. Invece, per gli sferoidi è stata osservata una minor resistenza, rispetto al modello bioprinting.

Gli sferoidi hanno spesso mostrato in letteratura un'elevata resistenza alla maggior parte delle terapie, incluse chemioterapie e radioterapie [98]. L'acquisizione della resistenza nei modelli 3D potrebbe essere spiegata da diversi meccanismi. Oltre alle caratteristiche biologiche, comprese le diverse interazioni con le cellule circostanti o con la matrice extracellulare e la maggiore eterogeneità fenotipica, un elemento importante da considerare è la penetrazione del farmaco nello sferoide. I grandi sferoidi mostravano una maggiore resistenza ai farmaci rispetto a quelli piccoli e la penetrazione del farmaco è limitata allo strato esterno.

Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato sferoidi di  $>500\ \mu\text{m}$  di diametro, nei quali la resistenza ai farmaci potrebbe essere attribuibile solo alle loro dimensioni, come accennato in precedenza [95]. Le cellule in strutture biostampate formavano sferoidi che dopo 12 giorni hanno un diametro eterogeneo e  $<500\ \mu\text{m}$ ; tuttavia, come indicato dall'IC50, esprimevano una farmacoresistenza in alcuni casi simile a quella degli sferoidi. Tuttavia, anche in questo caso, il motivo potrebbe essere riconducibile ad una scarsa penetrazione del farmaco, e nel caso specifico attraverso l'idrogel.

L'analisi dello stato di attivazione di Src, bersaglio di dasatinib, si306 e PD1, ha evidenziato una ridotta capacità del farmaco di inibire la formazione della Src fosforilata. Pertanto, è plausibile che l'idrogel di alginato/gelatina generi un ostacolo alla diffusione dei composti analizzati all'interno delle strutture biostampate. La resistenza ai composti presi in esame era evidente anche quando le cellule venivano recuperate dalla struttura biostampata e sottoposte al test di migrazione. Infatti, rispetto alla prevista riduzione della migrazione dimostrata dalle cellule trattate in coltura 2D, le cellule provenienti da strutture biostampate hanno mantenuto una maggiore capacità di migrazione. La resistenza ai farmaci non era apparentemente associata a un cambiamento nel fenotipo, infatti, la suscettibilità ai composti in questione nella coltura tissutale 3D è stata confermata dal test di disseminazione eseguito con sferoidi. In questo test, tutti i 3 i composti analizzati sono risultati efficaci nel ridurre la capacità delle cellule di invadere il microambiente circostante. Poiché le cellule coinvolte nella disseminazione sono principalmente quelle presenti sulla superficie dello sferoide, ciò avvalorava l'ipotesi della scarsa penetrazione del farmaco all'interno della struttura 3D.

Il bioprinting 3D offre diversi vantaggi come: il controllo accurato della distribuzione cellulare, la deposizione cellulare ad alta risoluzione, la scalabilità e l'economicità. La qualità dell'impalcatura biostampata finale è influenzata dalla sua biocompatibilità, biodegradabilità, risposta cellulare e il microambiente tissutale in cui è esposto [99]. Inoltre, i costrutti biostampati in 3D con pori interconnessi e ampie aree superficiali supportano l'adesione e la crescita cellulare, la comunicazione intercellulare, lo scambio di ossigeno e nutrienti e tutto ciò rappresenta un notevole vantaggio [100]. Il bioprinting porta anche alla riduzione della necessità di utilizzo di test sugli animali che non sono in grado di prevedere con precisione le risposte tossicologiche e fisiopatologiche umane. Tutte queste caratteristiche ci hanno spinto al suo utilizzo nelle nostre procedure sperimentali, rispetto alla formazione di sferoidi mediante il metodo della goccia sospesa che viene eseguito manualmente. Infatti, il metodo della goccia sospesa richiede un operatore esperto e le sue complicazioni tecniche ne compromettono la riproducibilità e lo rendono inadatto allo screening di nuovi potenziali composti antitumorale ad alta produttività. Inoltre, la produzione di sferoidi compatti e omogenei risulta essere complicata ed è per questo motivo che emergono

costantemente nuove tecniche 3D. Queste includono nuove piattaforme di progettazione in grado di assicurare una maggiore resa di formazione di sferoidi di dimensioni uniformi [101]. Tuttavia, in queste procedure, come in tutti i metodi di coltura cellulare in sospensione, un contenitore con superficie non aderente affidabile è fondamentale per assicurarne la riproducibilità nella formazione e nel loro comportamento per tutta la durata della coltura.

L'uso dell'idrogel come materiale di inclusione può garantire che le cellule possano organizzarsi in un'architettura 3D stabile, complessa e dinamica entrando in contatto anche con la matrice extracellulare. Il bioprinting 3D non richiede particolari competenze e consente di ottenere più strutture uniformi in breve tempo. L'idrogel di alginato/gelatina supporta la crescita 3D delle cellule tumorali e, come abbiamo osservato anche nei nostri modelli sperimentali, le cellule formavano spontaneamente sferoidi senza la necessità di un'ulteriore procedura repulsiva. Inoltre, le strutture biostampate, per la loro stabilità chimico-fisica che consente un regolare cambio di mezzo senza influenzare il comportamento cellulare, offrono la possibilità di eseguire facilmente test di vitalità. Allo stesso tempo, l'idrogel di alginato/gelatina può essere disciolto con una soluzione chelante di ioni, liberando sferoidi che una volta in sospensione potrebbero essere utilizzati per ulteriori analisi.

Con questo lavoro, abbiamo verificato come il bioprinting 3D, può avere caratteristiche biologiche più vicine al tumore in vivo, e simili alle strutture sferoidali che sono state finora utilizzate come miglior modello tumorale 3D. La biostampa è quindi in grado di offrire una valida alternativa per lo studio della citotossicità di nuovi potenziali composti antitumorali e per la valutazione delle caratteristiche fenotipiche tumorali in ambienti tridimensionali.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Amata I, Maffei M, Pons M. Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Front Genet.* 2014 Jun 30;5:181. doi: 10.3389/fgene.2014.00181. PMID: 25071818; PMCID: PMC4075076.
2. Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jun;2(6):467-75. doi: 10.1038/35073094. PMID: 11389470.
3. Stehelin D, Fujita DJ, Padgett T, Varmus HE, Bishop JM. Detection and enumeration of transformation-defective strains of avian sarcoma virus with molecular hybridization. *Virology.* 1977 Feb;76(2):675-84. doi: 10.1016/0042-6822(77)90250-1. PMID: 190771.
4. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 1976 Mar 11;260(5547):170-3. doi: 10.1038/260170a0. PMID: 176594.
5. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 1911 Apr 1;13(4):397-411. doi: 10.1084/jem.13.4.397. PMID: 19867421; PMCID: PMC2124874.
6. Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Mar;77(3):1311-5. doi: 10.1073/pnas.77.3.1311. PMID: 6246487; PMCID: PMC348484.
7. Angelucci A. Targeting Tyrosine Kinases in Cancer: Lessons for an Effective Targeted Therapy in the Clinic. *Cancers (Basel).* 2019 Apr 6;11(4):490. doi: 10.3390/cancers11040490. PMID: 30959887; PMCID: PMC6520702.
8. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009 Oct;6(10):587-95. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.129. PMID: 19787002.
9. Rai K. Personalized Cancer Therapy: YES1 Is the New Kid on the Block. *Cancer Res.* 2019 Nov 15;79(22):5702-5703. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2995. PMID: 31772072.
10. Stein PL, Vogel H, Soriano P. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev.* 1994 Sep 1;8(17):1999-2007. doi: 10.1101/gad.8.17.1999. PMID: 7958873.

11. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34. doi: 10.1126/science.1075762. PMID: 12471243.
12. Martins-Green M, Bixby JL, Yamamoto T, Graf T, Sudol M. Tissue specific expression of Yrk kinase: implications for differentiation and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000 Mar;32(3):351-64. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00118-1. PMID: 10716632.
13. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigyaró CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419. doi: 10.1126/science.1260419. PMID: 25613900.
14. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, Benfeitas R, Arif M, Liu Z, Edfors F, Sanli K, von Feilitzen K, Oksvold P, Lundberg E, Hober S, Nilsson P, Mattsson J, Schwenk JM, Brunnström H, Glimelius B, Sjöblom T, Edqvist PH, Djureinovic D, Micke P, Lindskog C, Mardinoglu A, Pontén F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. 2017 Aug 18;357(6352):eaan2507. doi: 10.1126/science.aan2507. PMID: 28818916.
15. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Dec;22(4):337-58. doi: 10.1023/a:1023772912750. PMID: 12884910.
16. Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 26;324(4):1155-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.171. PMID: 15504335.
17. Brown MT, Cooper JA. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun 7;1287(2-3):121-49. doi: 10.1016/0304-419x(96)00003-0. PMID: 8672527.
18. Kaplan KB, Bibbins KB, Swedlow JR, Arnaud M, Morgan DO, Varmus HE. Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *EMBO J*. 1994 Oct 17;13(20):4745-56. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06800.x. PMID: 7525268; PMCID: PMC395413.

19. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):237-48. doi: 10.1016/0092-8674(95)90406-9. PMID: 7834743.
20. Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7918-27. doi: 10.1038/sj.onc.1208081. PMID: 15489910.
21. Chong YP, Mulhern TD, Cheng HC. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors*. 2005 Sep;23(3):233-44. doi: 10.1080/08977190500178877. PMID: 16243715
22. Kmiecik TE, Shalloway D. Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell*. 1987 Apr 10;49(1):65-73. doi: 10.1016/0092-8674(87)90756-2. PMID: 3103925.
23. Roskoski R Jr. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 May 27;331(1):1-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.012. PMID: 15845350.
24. Abram CL, Courtneidge SA. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res*. 2000 Jan 10;254(1):1-13. doi: 10.1006/excr.1999.4732. PMID: 10623460.
25. Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem*. 2000 Dec 29;275(52):41439-46. doi: 10.1074/jbc.M004852200. PMID: 11007774.
26. Wang D, Esselman WJ, Cole PA. Substrate conformational restriction and CD45-catalyzed dephosphorylation of tail tyrosine-phosphorylated Src protein. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40428-33. doi: 10.1074/jbc.M206467200. Epub 2002 Aug 13. PMID: 12181320.
27. Huntington ND, Tarlinton DM. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett*. 2004 Jul 15;94(3):167-74. doi: 10.1016/j.imlet.2004.05.011. PMID: 15275963.
28. Poole AW, Jones ML. A SHPping tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal*. 2005 Nov;17(11):1323-32. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.05.016. PMID: 16084691.

29. Somani AK, Bignon JS, Mills GB, Siminovitch KA, Branch DR. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):21113-9. doi: 10.1074/jbc.272.34.21113. PMID: 9261115.
30. Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G, Araki T, Luo J, Thompson JA, Schraven BL, Philips MR, Neel BG. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell.* 2004 Feb 13;13(3):341-55. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00050-4. PMID: 14967142.
31. Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene.* 2000 Nov 20;19(49):5620-35. doi: 10.1038/sj.onc.1203923. PMID: 11114743.
32. Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Jun 21;1602(2):114-30. doi: 10.1016/s0304-419x(02)00040-9. PMID: 12020799.
33. Patel A, Sabbineni H, Clarke A, Somanath PR. Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci.* 2016 Jul 15;157:52-61. doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.036. Epub 2016 May 28. PMID: 27245276; PMCID: PMC4956571.
34. Thomas JW, Ellis B, Boerner RJ, Knight WB, White GC 2nd, Schaller MD. SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):577-83. doi: 10.1074/jbc.273.1.577. PMID: 9417118.
35. Espada J, Martín-Pérez J. An Update on Src Family of Nonreceptor Tyrosine Kinases Biology. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;331:83-122. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.09.009. Epub 2016 Nov 21. PMID: 28325216.
36. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jun;4(6):470-80. doi: 10.1038/nrc1366. PMID: 15170449.
37. Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene.* 2000 Nov 20;19(49):5636-42. doi: 10.1038/sj.onc.1203912. PMID: 11114744.
38. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.* 1996 Jan 12;271(2):695-701. doi: 10.1074/jbc.271.2.695. PMID: 8557675.
39. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweiko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D,

- Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem.* 2004 Dec 30;47(27):6658-61. doi: 10.1021/jm049486a. PMID: 15615512.
40. Martellucci S, Clementi L, Sabetta S, Mattei V, Botta L, Angelucci A. Src Family Kinases as Therapeutic Targets in Advanced Solid Tumors: What We Have Learned so Far. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 2;12(6):1448. doi: 10.3390/cancers12061448. PMID: 32498343; PMCID: PMC7352436.
41. Puzstai L, Moulder S, Altan M, Kwiatkowski D, Valero V, Ueno NT, Esteva FJ, Avritscher R, Qi Y, Strauss L, Hortobagyi GN, Hatzis C, Symmans WF. Gene signature-guided dasatinib therapy in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 15;20(20):5265-71. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0800. Epub 2014 Aug 29. Erratum in: *Clin Cancer Res.* 2015 Jun 1;21(11):2653. PMID: 25172932.
42. Nešović M, Divac Rankov A, Podolski-Renić A, Nikolić I, Tasić G, Mancini A, Schenone S, Pešić M, Dinić J. Src Inhibitors Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines, Si306 and Pro-Si306, Inhibit Focal Adhesion Kinase and Suppress Human Glioblastoma Invasion In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 14;12(6):1570. doi: 10.3390/cancers12061570. PMID: 32545852; PMCID: PMC7352231.
43. Calgani A, Vignaroli G, Zamperini C, Coniglio F, Festuccia C, Di Cesare E, Gravina GL, Mattei C, Vitale F, Schenone S, Botta M, Angelucci A. Suppression of SRC Signaling Is Effective in Reducing Synergy between Glioblastoma and Stromal Cells. *Mol Cancer Ther.* 2016 Jul;15(7):1535-44. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-1011. Epub 2016 May 11. PMID: 27196762.
44. Molinari A, Iovenitti G, Mancini A, Gravina GL, Chebbi M, Caruana M, Vignaroli G, Orofino F, Rango E, Angelucci A, Dreassi E, Schenone S, Botta M. AuNP Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Nanosystem in Combination with Radiotherapy against Glioblastoma. *ACS Med Chem Lett.* 2020 Mar 5;11(5):664-670. doi: 10.1021/acsmchemlett.9b00538. PMID: 32435368; PMCID: PMC7236040.
45. Vignaroli G, Calandro P, Zamperini C, Coniglio F, Iovenitti G, Tavanti M, Colecchia D, Dreassi E, Valoti M, Schenone S, Chiariello M, Botta M. Improvement of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines pharmacokinetic properties: nanosystem approaches for drug delivery. *Sci*

- Rep. 2016 Feb 22;6:21509. doi: 10.1038/srep21509. PMID: 26898318; PMCID: PMC4761914.
46. Tintori C, Fallacara AL, Radi M, Zamperini C, Dreassi E, Crespan E, Maga G, Schenone S, Musumeci F, Brullo C, Richters A, Gasparrini F, Angelucci A, Festuccia C, Delle Monache S, Rauh D, Botta M. Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-Src inhibitors active in vivo against neuroblastoma. *J Med Chem.* 2015 Jan 8;58(1):347-61. doi: 10.1021/jm5013159. Epub 2014 Dec 3. PMID: 25469771.
  47. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell.* 2007 Aug 24;130(4):601-10. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.006. PMID: 17719539.
  48. Justice BA, Badr NA, Felder RA. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today.* 2009 Jan;14(1-2):102-7. doi: 10.1016/j.drudis.2008.11.006. Epub 2008 Dec 26. PMID: 19049902.
  49. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020 Mar 6;7:33. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033. PMID: 32211418; PMCID: PMC7067892.
  50. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):839-45. doi: 10.1038/nrm2236. PMID: 17684528.
  51. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci.* 2012 Jul 1;125(Pt 13):3015-24. doi: 10.1242/jcs.079509. Epub 2012 Jul 13. PMID: 22797912; PMCID: PMC3434846.
  52. Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, van der Kuip H; IMI PREDECT Consortium. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J.* 2014 Sep;9(9):1115-28. doi: 10.1002/biot.201300492. PMID: 25174503.
  53. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011 May;11(5):325-37. doi: 10.1038/nrc3038. Epub 2011 Apr 14. Erratum in: *Nat Rev Cancer.* 2011 Aug;11(8):618. PMID: 21508971.
  54. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct 3;99(19):1441-54. doi: 10.1093/jnci/djm135. Epub 2007 Sep 25. PMID: 17895480.

55. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1988 Apr 8;240(4849):177-84. doi: 10.1126/science.2451290. PMID: 2451290.
56. Theodoraki MA, Rezende CO Jr, Chantarasriwong O, Corben AD, Theodorakis EA, Alpaugh ML. Spontaneously-forming spheroids as an in vitro cancer cell model for anticancer drug screening. *Oncotarget*. 2015 Aug 28;6(25):21255-67. doi: 10.18632/oncotarget.4013. PMID: 26101913; PMCID: PMC4673263.
57. Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog*. 2013 Mar;52(3):167-82. doi: 10.1002/mc.21844. Epub 2011 Dec 7. PMID: 22162252.
58. Hardelauf H, Frimat JP, Stewart JD, Schormann W, Chiang YY, Lampen P, Franzke J, Hengstler JG, Cadenas C, Kunz-Schughart LA, West J. Microarrays for the scalable production of metabolically relevant tumour spheroids: a tool for modulating chemosensitivity traits. *Lab Chip*. 2011 Feb 7;11(3):419-28. doi: 10.1039/c0lc00089b. Epub 2010 Nov 16. PMID: 21079873.
59. Timmins NE, Harding FJ, Smart C, Brown MA, Nielsen LK. Method for the generation and cultivation of functional three-dimensional mammary constructs without exogenous extracellular matrix. *Cell Tissue Res*. 2005 Apr;320(1):207-10. doi: 10.1007/s00441-004-1064-6. Epub 2005 Feb 16. PMID: 15714278.
60. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Oct;12(10):1347-60. doi: 10.1517/14712598.2012.707181. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22784238; PMCID: PMC4295205.
61. Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, Bronk LF, Ananta JS, Mandelin J, Georgescu MM, Bankson JA, Gelovani JG, Killian TC, Arap W, Pasqualini R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat Nanotechnol*. 2010 Apr;5(4):291-6. doi: 10.1038/nnano.2010.23. Epub 2010 Mar 14. PMID: 20228788; PMCID: PMC4487889.
62. Wang Z, Yang P, Xu H, Qian A, Hu L, Shang P. Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis. *Bioelectromagnetics*. 2009 Sep;30(6):446-53. doi: 10.1002/bem.20501. PMID: 19405043.
63. Yang Z, Xu H, Zhao X. Designer Self-Assembling Peptide Hydrogels to Engineer 3D Cell Microenvironments for Cell Constructs Formation and Precise Oncology Remodeling in

- Ovarian Cancer. *Adv Sci (Weinh)*. 2020 Mar 20;7(9):1903718. doi: 10.1002/advs.201903718. PMID: 32382486; PMCID: PMC7201262.
64. Kumar S, Weaver VM. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Jun;28(1-2):113-27. doi: 10.1007/s10555-008-9173-4. PMID: 19153673; PMCID: PMC2658728.
65. Sawicki LA, Choe LH, Wiley KL, Lee KH, Kloxin AM. Isolation and Identification of Proteins Secreted by Cells Cultured within Synthetic Hydrogel-Based Matrices. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018 Mar 12;4(3):836-845. doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00647. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29552635; PMCID: PMC5850091.
66. Brown NH. Extracellular matrix in development: insights from mechanisms conserved between invertebrates and vertebrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Dec 1;3(12):a005082. doi: 10.1101/cshperspect.a005082. PMID: 21917993; PMCID: PMC3225944.
67. Walters BD, Stegemann JP. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomater*. 2014 Apr;10(4):1488-501. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.038. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24012608; PMCID: PMC3947739.
68. Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Feb 1;97:41-55. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.017. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26743193.
69. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2013 Nov 1;2013(3):316-42. doi: 10.5339/gcsp.2013.38. PMID: 24689032; PMCID: PMC3963751.
70. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:929-58. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833. PMID: 19344236; PMCID: PMC2846778.
71. Baker EL, Bonnecaze RT, Zaman MH. Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys J*. 2009 Aug 19;97(4):1013-21. doi: 10.1016/j.bpj.2009.05.054. PMID: 19686648; PMCID: PMC2726313.
72. Wüst S, Müller R, Hofmann S. Controlled Positioning of Cells in Biomaterials-Approaches Towards 3D Tissue Printing. *J Funct Biomater*. 2011 Aug 4;2(3):119-54. doi: 10.3390/jfb2030119. PMID: 24956301; PMCID: PMC4030943.
73. Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials*. 2012

- Sep;33(26):6020-41. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.050. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22681979.
74. Peng W, Datta P, Ayan B, Ozbolat V, Sosnoski D, Ozbolat IT. 3D bioprinting for drug discovery and development in pharmaceuticals. *Acta Biomater.* 2017 Jul 15;57:26-46. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.025. Epub 2017 May 10. PMID: 28501712.
75. Hölzl K, Lin S, Tytgat L, Van Vlierberghe S, Gu L, Ovsianikov A. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication.* 2016 Sep 23;8(3):032002. doi: 10.1088/1758-5090/8/3/032002. PMID: 27658612.
76. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 2001 Jul;101(7):1869-79. doi: 10.1021/cr000108x. PMID: 11710233.
77. Lee HJ, Kim YB, Ahn SH, Lee JS, Jang CH, Yoon H, Chun W, Kim GH. A New Approach for Fabricating Collagen/ECM-Based Bioinks Using Preosteoblasts and Human Adipose Stem Cells. *Adv Healthc Mater.* 2015 Jun 24;4(9):1359-68. doi: 10.1002/adhm.201500193. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25874573.
78. Loo Y, Lakshmanan A, Ni M, Toh LL, Wang S, Hauser CA. Peptide Bioink: Self-Assembling Nanofibrous Scaffolds for Three-Dimensional Organotypic Cultures. *Nano Lett.* 2015 Oct 14;15(10):6919-25. doi: 10.1021/acs.nanolett.5b02859. Epub 2015 Sep 18. PMID: 26214046.
79. Lee DY, Lee H, Kim Y, Yoo SY, Chung WJ, Kim G. Phage as versatile nanoink for printing 3-D cell-laden scaffolds. *Acta Biomater.* 2016 Jan;29:112-124. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.004. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26441128.
80. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012 Jan;37(1):106-126. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. PMID: 22125349; PMCID: PMC3223967.
81. Caliri SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods.* 2016 Apr 28;13(5):405-14. doi: 10.1038/nmeth.3839. PMID: 27123816; PMCID: PMC5800304.
82. Zhang Y, Yu Y, Akkouch A, Dababneh A, Dolati F, Ozbolat IT. In Vitro Study of Directly Bioprinted Perfusable Vasculature Conduits. *Biomater Sci.* 2015 Jan;3(1):134-43. doi: 10.1039/C4BM00234B. PMID: 25574378; PMCID: PMC4283831.
83. de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials.* 2006 Nov;27(32):5603-17. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.010. Epub 2006 Aug 1. PMID: 16879864.

84. Tasoglu S, Demirci U. Bioprinting for stem cell research. *Trends Biotechnol.* 2013 Jan;31(1):10-9. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.005. Epub 2012 Dec 19. PMID: 23260439; PMCID: PMC3534918.
85. Matsiko A, Gleeson JP, O'Brien FJ. Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition. *Tissue Eng Part A.* 2015 Feb;21(3-4):486-97. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0545. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25203687.
86. Ozbolat IT, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials.* 2016 Jan;76:321-43. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.076. Epub 2015 Oct 31. PMID: 26561931.
87. O'Brien CM, Holmes B, Faucett S, Zhang LG. Three-dimensional printing of nanomaterial scaffolds for complex tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2015 Feb;21(1):103-14. doi: 10.1089/ten.TEB.2014.0168. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25084122; PMCID: PMC4322091.
88. Hospodiuk M, Dey M, Sosnoski D, Ozbolat IT. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv.* 2017 Mar-Apr;35(2):217-239. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.12.006. Epub 2017 Jan 3. PMID: 28057483.
89. Derakhshanfar S, Mbeleck R, Xu K, Zhang X, Zhong W, Xing M. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. *Bioact Mater.* 2018 Feb 20;3(2):144-156. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008. PMID: 29744452; PMCID: PMC5935777.
90. Thomas M, Willerth SM. 3-D Bioprinting of Neural Tissue for Applications in Cell Therapy and Drug Screening. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017 Nov 17;5:69. doi: 10.3389/fbioe.2017.00069. PMID: 29204424; PMCID: PMC5698280.
91. Davoodi E, Sarikhani E, Montazerian H, Ahadian S, Costantini M, Swieszkowski W, Willerth S, Walus K, Mofidfar M, Toyserkani E, Khademhosseini A, Ashammakhi N. Extrusion and Microfluidic-based Bioprinting to Fabricate Biomimetic Tissues and Organs. *Adv Mater Technol.* 2020 Aug;5(8):1901044. doi: 10.1002/admt.201901044. Epub 2020 May 26. PMID: 33072855; PMCID: PMC7567134.
92. Gudapati H, Dey M, Ozbolat I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. *Biomaterials.* 2016 Sep;102:20-42. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.012. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27318933.
93. Matai I, Kaur G, Seyedsalehi A, McClinton A, Laurencin CT. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials.* 2020 Jan;226:119536. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536. Epub 2019 Oct 11. PMID: 31648135.

94. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, Bareille R, Rémy M, Bordenave L, Amédée J, Guillemot F. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*. 2010 Oct;31(28):7250-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.05.055. Epub 2010 Jul 2. PMID: 20580082.
95. Thakuri PS, Gupta M, Plaster M, Tavana H. Quantitative Size-Based Analysis of Tumor Spheroids and Responses to Therapeutics. *Assay Drug Dev Technol*. 2019 Apr;17(3):140-149. doi: 10.1089/adt.2018.895. PMID: 30958703; PMCID: PMC6599382.
96. Han SJ, Kwon S, Kim KS. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int*. 2021 Mar 4;21(1):152. doi: 10.1186/s12935-021-01853-8. PMID: 33663530; PMCID: PMC7934264.
97. Gungor-Ozkerim PS , Inci I , Zhang YS , Khademhosseini A , Dokmeci MR . Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomater Sci*. 2018 May 1;6(5):915-946. doi: 10.1039/c7bm00765e. PMID: 29492503; PMCID: PMC6439477.
98. Gong X, Lin C, Cheng J, Su J, Zhao H, Liu T, Wen X, Zhao P. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. *PLoS One*. 2015 Jun 19;10(6):e0130348. doi: 10.1371/journal.pone.0130348. PMID: 26090664; PMCID: PMC4474551.
99. Li J, Chen M, Fan X, Zhou H. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *J Transl Med*. 2016 Sep 20;14:271. doi: 10.1186/s12967-016-1028-0. PMID: 27645770; PMCID: PMC5028995.
100. Knowlton S, Anand S, Shah T, Tasoglu S. Bioprinting for Neural Tissue Engineering. *Trends Neurosci*. 2018 Jan;41(1):31-46. doi: 10.1016/j.tins.2017.11.001. Epub 2017 Dec 6. PMID: 29223312
101. Chen YC, Lou X, Zhang Z, Ingram P, Yoon E. High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photo Dynamic Therapy in 3D Cell Cultures. *Sci Rep*. 2015 Jul 8;5:12175. doi: 10.1038/srep12175. PMID: 26153550; PMCID: PMC4495468.

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 “Dottorati Innovativi con caratterizzazione industriale”



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



*Ministero dell'Università  
e della Ricerca*

