

Dalle colture cellulari bidimensionali agli organoidi: il progresso nel campo delle patologie neoplastiche

Federica Di Maggio^{1,2}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli

²Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, Università di Napoli, "Federico II"

Questo lavoro è stato in parte presentato al 54° Congresso SIBioC - Genova, 5-7 Ottobre 2022, ricevendo il premio quale miglior poster

ABSTRACT

From bidimensional cell cultures to organoids: the progress in the field of neoplasia

Neoplasia continues to be the second leading cause of death worldwide after cardiovascular diseases. In the context of neoplasia, the case of cell cultures is fundamental for understanding and studying possible pharmacological treatments for this heterogeneous and complex pathology. The use of preclinical models has become increasingly prevalent; the currently most used model involves 2D cell cultures, but despite their great versatility, they have shown limitations in reproducing the complex structures and interactions that occur during carcinogenesis. Therefore, with the advent of 3D cultures, such as spheroids and organoids, preclinical research has significantly improved, as these models can reproduce some typical characteristics of the tissue from which they derive, including tumour tissue. Different protocols have been published for creating 3D cultures based on the use of a scaffold or even without it (scaffold-free). Thanks to numerous studies conducted using 3D cultures, directly stabilized from patient tissues, the great importance of these models, particularly for precision medicine, has been appreciated. They can be fully integrated into preclinical research as well as at the clinical level.

Parole Chiave: *culture cellulari, organoidi, medicina di precisione*

INTRODUZIONE

Il cancro continua ad essere un grave problema di salute a livello globale. Ad oggi, è la seconda causa di morte nel mondo, causando un decesso su sei (1). Nel 2023, in Italia sono stati diagnosticati circa 395 000 nuovi casi di cancro; ancora oggi, il carcinoma della mammella rimane il più diagnosticato, seguito da colon-retto, polmone, prostata e vescica (2). Nonostante negli ultimi due anni ci sia stato un incremento dell'incidenza di nuovi tumori, d'altra parte, si osserva un miglioramento nel numero di decessi, che stanno lentamente diminuendo (3,4). Proprio quest'ultimo indice sembra essere migliorato per diversi motivi tra cui: programmi di screening più diffusi sul territorio, che permettono di

effettuare diagnosi sempre più precoci, terapie mirate volte ad una medicina maggiormente personalizzata, come quella di precisione (1,5,6).

Nonostante i significativi progressi nella ricerca scientifica, permangono tuttavia delle criticità nello studio di questa patologia complessa ed eterogenea, che mostra dei limiti nella comprensione e nello sviluppo anche di nuove terapie (7). Gli avanzamenti nelle scienze omiche hanno rilevato la presenza di diverse popolazioni cellulari, spesso definite "sottopopolazioni", con specifiche mutazioni patogenetiche, che costituiscono nell'insieme la popolazione tumorale dello specifico individuo/paziente. Tali studi hanno altresì evidenziato una notevole eterogeneità genetica dei tumori, classificata nel tempo come intra- o inter- tumorale (8,9). L'eterogeneità

Corrispondenza a: Federica Di Maggio, CEINGE-Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Via G.Salvatore 486, 80145, Napoli - Email: dimaggio@ceinge.unina.it

Ricevuto: 21.05.2024

Rivisto: 08.06.2024

Accettato: 30.07.2024

Published on-line: 29.08.2024

DOI: 10.19186/BC_2024.044

intratumorale si riferisce alla diversità cellulare ed extracellulare spazio-temporale all'interno del tumore di un dato paziente, comprendendo sia il tumore primario che le popolazioni metastatiche. Pertanto, in questo caso, si considera solo ciò che avviene nel paziente in esame, concentrando l'attenzione sulle possibili alterazioni fisiopatologiche, genomiche, ed anche epigenomiche (in particolare il metiloma) specifiche di quel paziente. Invece, l'eterogeneità intertumorale descrive le variazioni, a livello di popolazione, tra pazienti con gli stessi sottotipi di tumore (10,11); i pazienti quindi vengono raggruppati e studiati come gruppo piuttosto che come singoli, poiché presentano aspetti simili ma non identici a livello fisiopatologico, genomico ed epigenomico. Questa estrema eterogeneità delle neoplasie, sia nel singolo paziente, ma anche tra i pazienti affetti dallo stesso tumore, e quindi in un sottogruppo specifico, ha evidenziato differenti risposte ai trattamenti farmacologici, mettendo in luce lo sviluppo di resistenze in alcuni pazienti (12,13). Ciò ha reso impossibile considerare le sottopopolazioni tumorali come una singola malattia, rendendo al contempo difficile l'ottimizzazione dei trattamenti, che non possono essere uguali per tutti i pazienti, ma tantomeno per individui affetti dallo stesso tipo di tumore. I trattamenti infatti, devono essere il più possibile mirati non solo all'organo colpito, ma anche al singolo paziente che ne è affetto (14,15).

In questo contesto, il progresso nel campo delle terapie antitumorali sembra infatti dipendere dallo sviluppo di tecnologie capaci di riprodurre *in vitro* le strutture e l'eterogeneità di ciascun tumore in ciascun paziente (16). Nonostante l'impiego di diversi modelli preclinici convenzionali, incluse le colture cellulari, le linee cellulari o xenotrapianti derivati da pazienti e modelli animali murini o non murini, si è assistito al fallimento di numerosi studi preclinici poiché questi modelli non riescono a riprodurre fedelmente la fisiopatologia dell'uomo (17).

Le colture cellulari sono state a lungo utilizzate per migliorare la comprensione della formazione e dei meccanismi patogenetici alla base della crescita tumorale. Tuttavia, la loro applicazione nell'uomo è spesso limitata poiché le linee cellulari non rappresentano fedelmente le caratteristiche tumorali originali. Per superare tali limitazioni, l'uso di modelli animali ha migliorato alcuni aspetti; tuttavia, il tasso di fallimento di farmaci antitumorali negli studi clinici rimane alto probabilmente perché i modelli animali non riflettono completamente la fisiologia umana (18,19). Pertanto, per superare almeno in parte, queste limitazioni è diventata sempre più consistente la necessità di studiare e utilizzare colture tridimensionali (3D) stabilizzate direttamente da tessuti di pazienti. Molti progressi sono stati fatti in questo campo soprattutto nello studio di colture di cellule staminali, anche tumorali, che si sono dimostrate un potente strumento per la formazione *in vitro*, di mini-organismi noti anche come "organoidi" (20,21).

Con le colture organotipiche è stata dimostrata la possibilità di generare *in vitro* colture tridimensionali che riproducono più accuratamente le strutture, le caratteristiche molecolari, le alterazioni genomiche,

l'espressione e il microambiente tumorale dei tumori primari dalle quali esse derivano (22); queste colture inoltre, hanno il vantaggio di poter essere generate da singolo paziente.

In questa rassegna vengono esaminati i differenti modelli *in vitro* e *in vivo* che possono essere impiegati nello studio delle patologie tumorali e non. Vengono descritte le caratteristiche e le applicazioni di ciascun modello, evidenziandone i vantaggi e le limitazioni. Viene anche considerato l'utilizzo dei suddetti modelli nel campo della terapia oncologica.

DALLE COLTURE 2D ALLE COLTURE 3D

L'importanza delle colture 2D

Le colture cellulari bidimensionali (2D) sono state ampiamente utilizzate negli anni nel campo della ricerca biomedica, per studiare ed approfondire sia gli aspetti di base, come la crescita cellulare, la proliferazione e il differenziamento, sia gli aspetti legati alla patogenesi di malattie tumorali e non, inclusi lo studio di farmaci (23-26). Le colture 2D sono considerate un sistema semplice ed economico, in cui le cellule crescono in sospensione o adese alla superficie della piastra (piastre Petri o multi-well) formando un monostrato (27). I vantaggi di questo sistema includono la facilità di utilizzo e la disponibilità di numerosi protocolli ormai standardizzati e riportati in letteratura. Tuttavia, questi modelli 2D rappresentano modelli "semplificati" dei tessuti e non riflettono l'organizzazione cellulare effettiva, la complessità delle cellule, comprese quelle tumorali, e le possibili interazioni cellulari che avvengono *in vivo*. Nonostante negli anni scorsi questo modello sia stato utilizzato per lo screening di farmaci ad alto rendimento, le sue limitazioni, come l'incapacità di replicare l'ambiente tridimensionale in cui i tumori crescono e la mancanza di interazioni cruciali tra le cellule e la matrice extracellulare, hanno evidenziato la necessità di sviluppare modelli più avanzati capaci di riprodurre più fedelmente la complessa struttura dei tessuti e quindi anche dei tumori. Pertanto, per superare le limitazioni riscontrate con questa tecnologia, pur ancora ampiamente utilizzata, la ricerca soprattutto nel campo oncologico, ha effettuato dei progressi per fornire nuovi modelli sempre più avanzati.

Dagli xenotrapianti alle colture 3D

La necessità di ottenere modelli preclinici che riflettano più accuratamente la fisiologia umana è cresciuta costantemente nel tempo. Gli xenotrapianti derivati da tessuti tumorali di pazienti (Patient derived tumor xenograft, PDXs), sono stati utilizzati con l'obiettivo di sviluppare modelli preclinici più rappresentativi dell'eterogeneità dei tumori nell'uomo e per approfondire e studiare l'efficacia dei farmaci chemioterapici (18,28,29). In questi modelli, le linee cellulari tumorali o le biopsie dei pazienti vengono trapiantate in topi immunodeficienti o geneticamente modificati (30). Grazie alla mancanza del sistema immunitario, questi topi sono in grado di tollerare e quindi, supportare la crescita del tessuto tumorale

umano. Una volta che il tumore si è sviluppato nel topo, è possibile condurre diversi studi, inclusi test sugli effetti dei farmaci e il monitoraggio della crescita tumorale tramite tecniche di imaging, al fine di valutare la progressione della malattia nel tempo (31,32).

Vari studi hanno dimostrato che i PDTX conservano l'eterogeneità dei tumori umani dai quali derivano, mostrandosi un'importante risorsa nell'ambito della ricerca oncologica in quanto, riescono a predire la risposta dei farmaci utilizzati, consentendo così lo sviluppo di terapie più mirate. D'altra parte, questi modelli mostrano significative limitazioni relativamente agli studi di immunoterapia, a causa della compromissione del sistema immunitario dei topi (28). Pertanto, se da un lato questa tecnologia ha rappresentato un avanzamento nella stabilizzazione di modelli pre-clinici, dall'altro presenta limitazioni dovute al consumo di un gran numero di animali e al conseguente elevato costo di questa tecnologia (19).

La necessità di sviluppare modelli che riflettano accuratamente l'architettura tumorale e consentano screening farmacologici personalizzati e combinati in tempi più rapidi è diventata sempre maggiore. Negli ultimi anni infatti, sono stati sviluppati diversi modelli 3D, come gli sferoidi e gli organoidi, direttamente dai tessuti dei pazienti.

Gli sferoidi e i loro utilizzi

Negli ultimi decenni, sono emerse nuove tecniche per la stabilizzazione delle colture cellulari 3D, volte a colmare il divario tra le colture cellulari e i modelli animali. Ad oggi, sono stati sviluppati vari modelli 3D, inclusi espianti di tessuti, sferoidi ed organoidi, che trovano un'ampia applicazione nella ricerca biomedica traslazionale (33).

Gli sferoidi sono stati introdotti per la prima volta all'inizio degli anni '70 da Sutherland et al., e da allora sono stati sviluppati diversi modelli di sferoidi e, soprattutto, differenti metodi per la loro generazione (34). Questi si formano per aggregazione spontanea delle cellule, seguita dal legame delle integrine della superficie cellulare alla matrice extracellulare (ECM) (35,36). Sono stati descritti due differenti metodi per la formazione degli sferoidi: uno basato sull'utilizzo di supporti (scaffold) e uno privo di supporto (scaffold-free). I metodi basati sull'utilizzo di scaffold, quindi utilizzando ECM, sono solitamente impiegati nelle applicazioni di ingegneria tissutale e di medicina rigenerativa. In questo caso, le cellule crescono a contatto con lo scaffold, che può essere costituito da sostanze naturali (come il collagene), biomateriali semisintetici (come il chitosano) o sintetici (come il policaprolattone) (37). I metodi scaffold-free, in cui l'ECM è composta da proteine prodotte dalle cellule stesse durante la loro formazione, sono maggiormente utilizzati perché sono relativamente semplici, economici e rapidi. Tra i metodi scaffold-free più noti si annoverano: Liquid Overlay, Hanging Drop, Spinner Culture, Rotating Wall Vessel (36,37).

Gli sferoidi tumorali sono considerati i modelli di coltura cellulare 3D più semplici e sono ampiamente utilizzati nella ricerca scientifica per la loro capacità di

emulare le proprietà dei tumori, soprattutto quelli solidi. Presentano sia interazioni cellula-cellula sia cellula-ECM e la loro struttura è simile a quella dei tumori non vascolarizzati o scarsamente vascolarizzati (37). Un grande vantaggio di questa tecnologia è legato alla possibilità di ottenere sferoidi di dimensioni differenti in base al numero iniziale di cellule utilizzate per la loro formazione; inoltre, è possibile formare sferoidi eterotipici mediante co-cultura con differenti tipi di cellule (38). Questa flessibilità rende la metodologia molto versatile ed ampiamente utilizzata, poiché permette all'operatore di scegliere il tipo e il numero di cellule con cui lavorare, controllando così il flusso di lavoro. Diversi studi hanno analizzato la struttura e la composizione degli sferoidi, riconoscendo tre differenti strati: uno esterno costituito da cellule proliferanti, che sono maggiormente a contatto con i nutrienti presenti nel mezzo, uno intermedio costituito da cellule quiescenti e infine, uno interno costituito da cellule ipossiche e necrotiche (39). Queste proprietà, soprattutto quando gli sferoidi sono formati da colture tumorali, conferiscono loro una buona resistenza ai farmaci antitumorali, rendendoli un valido strumento per studi di screening di farmaci (36). Negli ultimi anni, notevoli sforzi sono stati fatti per ottimizzare le tecniche di produzione degli sferoidi, grazie anche ai numerosi prodotti disponibili in commercio che hanno migliorato la riproducibilità della tecnica, consentendone un maggiore utilizzo anche negli screening ad alta produttività di terapie antitumorali.

Nonostante i significativi vantaggi e i progressi ottenuti con questo modello di colture 3D, esistono delle limitazioni legate alla scarsa riproducibilità della metodica nel formare sferoidi direttamente da tessuti derivanti da pazienti. In questo contesto, le colture di organoidi, si sono fatte spazio con lo scopo di migliorare le ricerche su modelli 3D più complessi, fedeli e riproducibili, capaci quindi di migliorare studi di ricerca biomedica aprendo nuove strade verso una medicina personalizzata.

Organoidi e tumoroidi: differenti modelli ampiamente utilizzati in ambito scientifico

La scoperta e l'isolamento delle cellule staminali pluripotenti umane (PSC) hanno notevolmente ampliato il potenziale di studio nell'ambito della ricerca scientifica, rivoluzionando l'approccio sia alla ricerca scientifica di base che al trattamento di alcune patologie anche genetiche rare e neonatali (40-42). Le PSC possono essere ottenute dalla massa cellulare interna della blastocisti umana o possono essere riprogrammate da cellule somatiche umane mediante l'utilizzo di differenti fattori di trascrizione; queste sono denominate rispettivamente cellule staminali embrionali umane e cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Le PSC possono quindi essere indirizzate verso specifici processi di differenziazione utilizzando segnali di sviluppo endogeni in coltura. Recenti studi hanno dimostrato la possibilità di creare colture cellulari 3D a partire da cellule staminali: gli organoidi.

Con il termine organoide, si fa riferimento a cellule che crescono *in vitro* in una coltura tridimensionale (3D),

formando cluster di cellule che si auto-organizzano e si differenziano in differenti tipi cellulari, riproducendo la struttura e la funzione dell'organo dal quale esse derivano (20,43). Gli organoidi possono essere stabilizzati a partire dalle cellule staminali embrionali (ESC), iPSC o adulte (ASC) (21,44) attraverso un processo che simula quello che l'organo stesso sperimenta per acquisire la sua organizzazione finale. Gli organoidi derivati da ESC/iPSC prevedono l'utilizzo di protocolli di differenziazione con fattori di crescita e/o inibitori per riprodurre i segnali generati *in vivo* durante i processi di gastrulazione e organogenesi (45). Questa strategia consente di generare organoidi da tutti e tre i foglietti embrionali, particolarmente utile per studi sullo sviluppo embrionale in fase iniziale (come ad esempio gli organoidi di cervello).

Gli organoidi derivati da ASC sono generati direttamente da tessuti umani, sia tumorali (tumoroidi) che non (organoidi), attraverso un processo di isolamento delle cellule staminali dal tessuto di origine mediante digestione enzimatica e meccanica (46,47). Successivamente, le cellule vengono mantenute in coltura con terreni selezionati contenenti fattori di crescita tessuto-specifici, che ne stimolano la crescita e ne permettono successive analisi.

Nel 2009 è stata pubblicata una delle prime ricerche che dimostrava la possibilità di stabilizzare gli organoidi intestinali in una ECM a partire da ASC che esprimono il recettore 5 accoppiato a proteine G (Lgr5). In coltura, queste cellule si auto-organizzano e si differenziano in strutture che riproducono la mucosa intestinale (48). Da allora, sono state poi generate con successo numerose colture organotipiche da diversi tipi di tessuti tumorali tra cui colon-retto (46,48), pancreas (49,50), prostata (51), ovaio (52), vescica (53), fegato (54), mammella (55), polmone (56), esofago (57), stomaco (58) e cervello (59). Tutti questi studi hanno dimostrato che queste colture 3D (organoidi e/o tumoroidi) riescono a riprodurre più

fedelmente rispetto alle colture 2D le caratteristiche del tumore originale da cui derivano.

Ad oggi, gli organoidi sono ampiamente utilizzati nell'ambito delle ricerche biomediche e trovano applicazione in diverse aree, tra cui lo screening ad alto rendimento di farmaci chemioterapici, lo studio della progressione della malattia, la medicina rigenerativa, le scienze omiche e la formazione di biobanche (60) (Figura 1).

COLTURA DEGLI ORGANOIDI E/O TUMOROIDI

Formazione dei tumoroidi da cellule staminali pluripotenti adulte

L'approccio maggiormente utilizzato per la stabilizzazione degli organoidi e/o tumoroidi prevede l'isolamento delle cellule staminali pluripotenti dai tessuti adulti dopo la loro rimozione chirurgica. Il tessuto, una volta giunto in laboratorio, viene sottoposto a delle fasi di digestione enzimatica e meccanica per ottenere le cellule, che vengono poi messe in coltura in ECM, scaffold biologici o sintetici che permettono loro di crescere in un ambiente tridimensionale (3D). Uno degli scaffold più utilizzati è il "matrigel", una ECM naturale purificata da sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Questo materiale viene molto utilizzato nella stabilizzazione di tumoroidi per impieghi nella ricerca biomedica, ma è meno utilizzato nella medicina rigenerativa. In quest'ultimo campo, la ricerca ha portato alla sperimentazione e all'utilizzo di nuovi biomateriali compatibili con ricerche in questo particolare settore come ad esempio idrogel di fibrina/laminina, che supportano la coltura a lungo termine di organoidi epiteliali derivati (61,62).

Una volta che la matrice si è solidificata, all'interno dell'incubatore contenente le cellule, viene ricoperta da

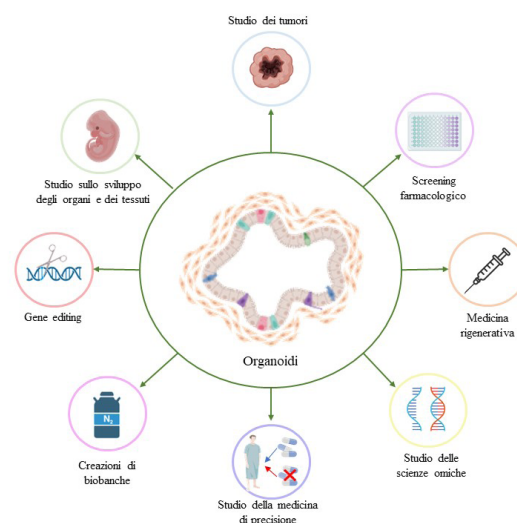


Figura 1

Possibili applicazioni degli organoidi nell'ambito della ricerca scientifica. Nella figura vengono rappresentate alcune delle possibili applicazioni per le quali gli organoidi e i tumoroidi possono essere impiegati.

un terreno di coltura complesso composto da diversi fattori di crescita e proteine ricombinanti specifici per tessuti e/o malattie diverse e favoriscono la crescita degli organoidi tumorali. Il mezzo utilizzato solitamente è un terreno di coltura avanzato modificato di Dulbecco (ADMEM)/F12, supplementato con GlutaMax, HEPES e, in alcuni casi, con penicillina/streptomina. Inoltre, altri componenti come fattori di crescita o antagonisti delle vie di segnalazione vengono aggiunti a seconda del tipo di tessuto originale da cui si stabilizzerà l'organoide (ad esempio R-spondina-1, Noggin, primocina, N2, EGF, FGF10, FGF7, fattore di crescita degli epatociti, Wnt3A, R-spondina-1, gastrina, prostaglandina E2, nicotinamide, neuregulina 1, N-acetilcisteina).

Ad oggi, esistono vari protocolli noti in letteratura per la stabilizzazione degli organoidi. Tuttavia, vi è una crescente necessità di dover meglio standardizzare questa metodica in quanto rimangono ancora differenze tra tessuti e protocolli che influenzano la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati. Questa standardizzazione è necessaria anche ai fini delle analisi che vengono effettuate sull'organoide una volta che esso è stato stabilizzato, come ad esempio analisi mutazionali, analisi di immunoistochimica e screening di farmaci ad alto rendimento.

Purificazione degli organoidi tumorali e co-coltura con cellule epiteliali

Uno dei problemi principali nella stabilizzazione degli organoidi tumorali è la contaminazione con cellule epiteliali normali. Questa possibile contaminazione deve essere minimizzata per rendere la coltura degli organoidi il più possibile simile al tessuto tumorale di partenza. Vari studi sono stati condotti sui metodi da utilizzare per selezionare esclusivamente le cellule tumorali che hanno evidenziato dei limiti, in particolare riguardo la perdita di eterogeneità cellulare rispetto alle colture iniziali. Pertanto, uno dei modi per verificare se l'organoide in coltura rispecchia effettivamente il tessuto tumorale di origine consiste nell'effettuare indagini molecolari che possano riconoscere varianti considerate patogeniche, oltre che condurre analisi di immunoistochimica e di microscopia. Proprio con quest'ultima tecnica, si è osservato che la struttura degli organoidi può essere differente e riconoscibile. Gli organoidi derivanti da cellule normali presentano una struttura simile a una cisti, mentre gli organoidi tumorali derivati da tumori epiteliali mostrano strutture simili al tessuto di origine: nel caso di adenocarcinomi ben differenziati, la struttura sarà ghiandolare, se poco differenziati invece si formerà una struttura a grappolo(62-64).

Il microambiente tumorale e co-coltura di organoidi

È noto come il microambiente tumorale (TME) sia implicato nei meccanismi di tumorigenesi e progressione tumorale, risultando fondamentale anche nelle ricerche cliniche per mimare il più possibile ciò che accade nel corpo umano (65,66). Il TME è costituito da cellule

non cancerose, che circondano il tumore stesso ed includono fibroblasti, cellule endoteliali, cellule immunitarie, matrice extracellulare e prodotti solubili quali chemochine, citochine e fattori di crescita. Le interazioni tra queste diverse componenti cellulari e le cellule tumorali influenzano significativamente lo sviluppo e la progressione del cancro (65,67).

Le cellule endoteliali, in particolare, sono fondamentali per lo sviluppo del tumore, poiché proteggono il tumore stesso da possibili interazioni con il sistema immunitario del paziente. I vasi angiogenici, contribuiscono alla crescita tumorale, ramificandosi a partire proprio da cellule endoteliali e fornendo nutrienti ed ossigeno. Un'altra componente fondamentale del TME sono i macrofagi, che svolgono funzioni legate allo sviluppo e alla progressione dei tumori, promuovendo risposte immunitarie antitumorali. Infine, i fibroblasti giocano un ruolo fondamentale nel favorire la migrazione delle cellule tumorali dalla sede primaria, favorendo la formazione di metastasi (68).

Considerata l'importanza del TME, molti studi sono stati condotti negli ultimi anni per sfruttare questa componente come obiettivo terapeutico. Infatti, è stato dimostrato che esistono vantaggi nel mirare al TME rispetto al colpire esclusivamente il tessuto tumorale (69).

In questo contesto, la tecnologia che vede la stabilizzazione degli organoidi e/o tumoroidi sta compiendo notevoli progressi per implementare studi di interazione con il TME. Sono stati sviluppati vari modelli che prevedono l'utilizzo delle componenti del TME e degli organoidi, come ad esempio metodi di co-coltura 3D e dispositivi di microfluidica, capaci di mimare le interazioni che si verificano nel corpo umano tra le cellule tumorali e le cellule contenute nel TME (70,71). Queste metodiche hanno impiegato principalmente cellule stromali o stromali primarie isolate dai tessuti di topo, ma sono necessari ulteriori sforzi in tal senso per comprendere i possibili risvolti nella ricerca. Ad oggi, la poca o nulla presenza del TME microambiente tumorale nelle colture di organoidi e/o tumoroidi resta un limite di questa tecnologia.

La genetica molecolare e i tumoroidi

I tumoroidi, così come gli organoidi, una volta stabilizzati possono essere utilizzati per diverse tipologie di analisi, inclusa l'analisi del sequenziamento degli acidi nucleici (DNA ed RNA) e l'analisi di microscopia per l'identificazione di differenti tipi cellulari presenti nelle colture stabilizzate. Queste indagini sono condotte per garantire che gli organoidi in coltura riflettano il più possibile l'assetto molecolare e cellulare del tessuto d'origine. Grazie anche ai progressi effettuati nel campo delle scienze omiche, sono disponibili diversi approcci per tale scopo, come il sequenziamento dell'intero genoma (WGS), sequenziamento dell'intero esoma (WES) e il sequenziamento mirato di pannello di geni (5,47,72,73). Inoltre, ulteriori approcci sono disponibili anche per approfondire aspetti legati all'epigenetica e alla metagenomica (74-76).

L'obiettivo principale per il quale si possono utilizzare questi diversi approcci è confrontare l'assetto genomico

della coltura in analisi per identificare sia i polimorfismi, sia le varianti patogenetiche presenti nel genoma derivante dal tumoroide/organoide e confrontarle con le varianti presenti nel genoma del tessuto tumorale di origine. Una buona corrispondenza tra la coltura 3D e il tessuto di partenza consente di effettuare ulteriori indagini e ricerche quale screening di farmaci, diretti verso le mutazioni specifiche presenti in ciascun paziente.

Proprio a tale scopo, le biobanche di organoidi e tumoroidi disponibili sono state sequenziate utilizzando diversi approcci e tecnologie all'avanguardia, fino ad arrivare all'utilizzo del sequenziamento di terza generazione. In diversi studi le analisi mutazionali hanno dimostrato una buona corrispondenza tra varianti ritrovate nel tessuto di partenza e quelle presenti nel tumoroide (46,57); offrendo così l'opportunità di iniziare anche screening farmacologici con l'uso di chemioterapici mirati ad una medicina sempre più personalizzata e di precisione. Inoltre, le analisi genetiche, insieme a quelle istologiche, hanno confermato che gli organoidi sono in grado di mantenere l'eterogeneità intratumorale del tessuto di origine, mostrando anche a livello cellulare una grande somiglianza con il tessuto da cui derivano. Anche gli studi di trascrittomica condotti sugli organoidi hanno evidenziato una buona corrispondenza nei profili di espressione genica tra i tumoroidi e il tessuto tumorale da cui derivano (77).

Nonostante i grandi progressi nella comprensione e nello studio di questi modelli tridimensionali, restano ancora da approfondire alcuni aspetti legati al possibile utilizzo di questa tecnologia anche per comprendere se questi modelli riescano effettivamente a riprodurre *in vitro* i complessi meccanismi che avvengono *in vivo* nei pazienti affetti da patologie tumorali.

In questo contesto, l'uso di tecniche "omiche" differenti e il progresso scientifico in questo settore saranno di grande importanza per approfondire ulteriormente gli aspetti riguardanti gli organoidi e per permettere a questa tecnologia di affermarsi sempre di più nell'ambito pre-clinico e clinico.

Applicazioni in campo clinico e uso degli organoidi per screening farmacologici

L'uso di colture cellulari è sempre stato di grande aiuto per studi e ricerche di farmaci, soprattutto nel campo oncologico, in particolare con l'uso di farmaci chemioterapici. Tuttavia, l'uso di colture 2D ha spesso portato al fallimento di studi clinici, poiché queste colture non riescono a riprodurre l'eterogeneità tumorale da cui esse derivano. Con l'avvento delle colture 3D, e in particolare con l'uso di organoidi e/o tumoroidi in campo pre-clinico, c'è stato un esteso utilizzo di queste colture per gli screening farmacologici. Questo è stato reso possibile grazie all'uso di tecnologie all'avanguardia come tecniche di sequenziamento di ultima generazione che hanno confermato le similarità degli organoidi con i tessuti tumorali di partenza, dando la possibilità di utilizzare questa tecnologia come strumento per testare anche farmaci chemioterapici.

Vari studi hanno confermato dapprima a livello molecolare e istologico, la validità degli organoidi, e

successivamente hanno testato l'efficacia di differenti farmaci chemioterapici per predire l'effetto di ciascun farmaco sull'organoide in esame (46,52,78). Questi studi hanno fornito risultati promettenti, evidenziando anche la rilevanza fisiologica di questa tecnologia rispetto alle colture 2D e sottolineando l'importanza di utilizzare gli organoidi per studi di correlazione tra la genetica del tumore e la risposta ai farmaci.

Questo senza dubbio rappresenta un passo avanti, soprattutto in un contesto in cui la medicina sta avanzando velocemente verso una medicina di precisione personalizzata, ponendo l'attenzione sui singoli pazienti che possono avere risposte differenti ai trattamenti, anche se affetti dalle stesse patologie, a causa anche di implicazioni genetiche molecolari.

CONCLUSIONI

Nonostante i grandi vantaggi che si possono attribuire agli studi sugli organoidi, ci sono comunque alcune limitazioni legate a questa tecnologia che attualmente ne precludono l'utilizzo in alcune sperimentazioni pre-cliniche. Il primo grande limite è rappresentato dal fallimento della stabilizzazione di queste colture a partire da alcuni organi. Infatti, la maggior parte degli studi pubblicati sono stati effettuati su tumori epiteliali, e ad oggi esistono poche biobanche che includono organoidi stabilizzati da tessuti tumorali non epiteliali (64,79). Inoltre, queste colture includono principalmente solo cellule tumorali neoplastiche e supportano con maggiore difficoltà le co-colture con altri tipi di cellule, limitando così lo studio di interazione anche con il TME. In parte, queste limitazioni possono essere attribuite anche all'uso di protocolli di coltura non standardizzati, che hanno introdotto una variabilità tecnica nelle colture *in vitro*.

Malgrado le limitazioni sopra discusse, questi modelli tridimensionali sono da considerarsi di importanza fondamentale. Svariati studi hanno dimostrato che gli organoidi riflettono la composizione genetica del cancro di origine; pertanto, sono di grande aiuto soprattutto nel campo della ricerca oncologica per effettuare screening di farmaci ad alto rendimento. Le colture di organoidi tumorali consentono pertanto, di studiare la dinamica clonale all'interno del cancro, una caratteristica critica dell'eterogeneità intratumorale, ma anche le possibili risposte delle cellule tumorali ai farmaci selezionati contribuendo alla medicina di precisione, che viene anche personalizzata per il singolo individuo.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Crosby D, Bhatia S, Brindle KM, Coussens LM, Dive C, Emberton M, et al. Early detection of cancer. *Science* 2022;375:eaay9040.
2. AIOM. I numeri del cancro in Italia. <https://www.aiom.it/i-numeri-del-cancro-in-italia/> (ultimo accesso: giugno 2024).
3. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin* 2024;74:12-49.
4. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics,

2021. *CA Cancer J Clin* 2021;71:7-33.
5. Nunziato M, Scaglione GL, Di Maggio F, Nardelli C, Capoluongo E, Salvatore F. The performance of multi-gene panels for breast/ovarian cancer predisposition. *Clin Chim Acta* 2023;539:151-61.
 6. Salvatore F. The shift of the paradigm between ageing and diseases. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1635-44.
 7. Yousef A, Ghobrial L, Diamandis EP. Tumor heterogeneity: how could we use it to achieve better clinical outcomes? *Diagnosis (Berl)* 2024;11:25-30.
 8. Danilenko M, Clifford SC, Schwalbe EC. Inter and intratumoral heterogeneity as a platform for personalized therapies in medulloblastoma. *Pharmacol Ther* 2021;228:107828.
 9. Di Maggio F, Damaggio G, Nunziato M, Buonaiuto S, Crocetto F, Calabrese A, et al. Predictive medicine in a testis trio-family through a combined multi-omics approach. *Clin Transl Med* 2024;14.
 10. Liu J, Dang H, Wang XW. The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer. *Exp Mol Med* 2018;50:e416.
 11. LeSavage BL, Suhar RA, Broguiere N, Lutolf MP, Heilshorn SC. Next-generation cancer organoids. *Nat Mater* 2022;21:143-59.
 12. Fountzilas E, Tsimberidou AM, Vo HH, Kurzrock R. Clinical trial design in the era of precision medicine. *Genome Med* 2022;14:101.
 13. Chern YJ, Tai IT. Adaptive response of resistant cancer cells to chemotherapy. *Cancer Biol Med* 2020;17:842-63.
 14. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature* 2019;575:299-309.
 15. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15:81-94.
 16. Roman V, Mihaila M, Radu N, Marineata S, Diaconu CC, Bostan M. Cell Culture Model Evolution and Its Impact on Improving Therapy Efficiency in Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2023;15:4996.
 17. Manduca N, Maccafeo E, De Maria R, Sistigu A, Musella M. 3D cancer models: One step closer to *in vitro* human studies. *Front Immunol* 2023;14:1175503.
 18. Abdolahi S, Ghazvinian Z, Muhammadnejad S, Saleh M, Asadzadeh Aghdaei H, Baghaei K. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J Transl Med* 2022;20:206.
 19. Jin J, Yoshimura K, Sewastjanow-Silva M, Song S, Ajani JA. Challenges and Prospects of Patient-Derived Xenografts for Cancer Research. *Cancers (Basel)* 2023;15:4352.
 20. Corró C, Novellasdemunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol* 2020;319:C151-65.
 21. Huch M, Koo BK. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 2015;142:3113-25.
 22. Ren X, Chen W, Yang Q, Li X, Xu L. Patient-derived cancer organoids for drug screening: Basic technology and clinical application. *J Gastroenterol Hepatol* 2022;37:1446-54.
 23. Fusco G, Picazio G, Cardillo L, Pucciarelli A, Marati L, Di Maggio F, et al. A comparative study on the persistence and viability of SARS-CoV-2 wild-type and omicron variant on artificially contaminated surfaces: the role of fomites. *Emerg Microbes Infect* 2023;12:2239941.
 24. Esposito MV, Minopoli G, Esposito L, D'Argenio V, Di Maggio F, Sasso E, et al. A Functional Analysis of the Unclassified Pro2767Ser BRCA2 Variant Reveals Its Potential Pathogenicity that Acts by Hampering DNA Binding and Homology-Mediated DNA Repair. *Cancers (Basel)* 2019;11:1454.
 25. D'Argenio V, Borrillo F, Cariati F, Di Maggio F, Tomaiuolo R. Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part I: General terms 2019;43:90-105.
 26. Bhattacharya A, Izzo A, Mollo N, Napolitano F, Limone A, Margheri F, et al. Inhibition of 37/67kda laminin-1 receptor restores app maturation and reduces amyloid- β in human skin fibroblasts from familial alzheimer's disease. *J Pers Med* 2020;10:232.
 27. Maggio FD, Borrillo F, Cariati F, Tomaiuolo R, D'Argenio V. Glossary of molecular biology and clinical molecular biology. Part II: Laboratory methodologies. *Biochim Clin* 2019;43:435-48.
 28. Goto T. Patient-derived tumor xenograft models: toward the establishment of precision cancer medicine. *J Pers Med* 2020;10:64.
 29. Fiore D, Cappelli LV, Zumbo P, Phillips JM, Liu Z, Cheng S, et al. A Novel JAK1 Mutant breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma patient-derived xenograft fostering pre-clinical discoveries. *Cancers (Basel)* 2020;12:1603.
 30. Zhu Y, Tian T, Li Z, Tang Z, Wang L, Wu J, et al. Establishment and characterization of patient-derived tumor xenograft using gastroscopic biopsies in gastric cancer. *Sci Rep* 2015;5:8542.
 31. Liu Y, Wu W, Cai C, Zhang H, Shen H, Han Y. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8:160.
 32. Lombardo B, Pagani M, De Rosa A, Nunziato M, Migliarini S, Garofalo M, et al. D-aspartate oxidase gene duplication induces social recognition memory deficit in mice and intellectual disabilities in humans. *Transl Psychiatry* 2022;12:305.
 33. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* 2021;22:12200.
 34. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1971;46:113-20.
 35. Lin RZ, Chou LF, Chien CCM, Chang HY. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res* 2006;324:411-22.
 36. Gunti S, Hoke ATK, Vu KP, London NR. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers (Basel)* 2021;13:874.
 37. Abuwatfa WH, Pitt WG, Hussein GA. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *J Biomed Sci* 2024;31:7.
 38. Yakavets I, Francois A, Benoit A, Merlin JL, Bezdetnaya L, Vogin G. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. *Sci Rep* 2020;10:21273.
 39. Vadivelu RK, Kamble H, Shiddiky MJA, Nguyen NT. Microfluidic Technology for the Generation of Cell Spheroids and Their Applications. *Micromachines (Basel)* 2017;8:94.
 40. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 2020;27:523-31.
 41. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
 42. D'Argenio V, Nunziato M, Uonno ND, Borrillo F, Vallone R, Conforti A, et al. Indications and limitations for preimplantation genetic diagnosis. *Biochimica Clinica* 2017;41:314-21.
 43. El Harane S, Zidi B, El Harane N, Krause KH, Matthes T, Preynat-Seauve O. Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine. *Cells* 2023;12:1001.
 44. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;345:1247125.

45. Schutgens F, Clevers H. Human Organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annu Rev Pathol* 2020;15:211-34.
46. Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science* 2018;359:920-6.
47. Di Maggio F, Boccia G, Nunziato M, Filotico M, Montesarchio V, D'Armiento M, et al. A Novel DNA Variant in SMARCA4 Gene found in a patient affected by early onset colon cancer. *Int J Mol Sci* 2024;25:2716.
48. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262-5.
49. Tiriác H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, et al. Organoid Profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Discov* 2018;8:1112-29.
50. Bengtsson A, Andersson R, Rahm J, Ganganna K, Andersson B, Ansari D. Organoid technology for personalized pancreatic cancer therapy. *Cell Oncol (Dordr)* 2021;44:251-60.
51. Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, et al. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016;11:347-58.
52. Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclán JE, Hami N, Kester L, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med* 2019;25:838-49.
53. Minoli M, Cantore T, Hanhart D, Kiener M, Fedrizzi T, La Manna F, et al. Bladder cancer organoids as a functional system to model different disease stages and therapy response. *Nat Commun* 2023;14:2214.
54. Shinozawa T, Kimura M, Cai Y, Saiki N, Yoneyama Y, Ouchi R, et al. High-fidelity drug-induced liver injury screen using human pluripotent stem cell-derived organoids. *Gastroenterology* 2021;160:831-46.e10.
55. Srivastava V, Huycke TR, Phong KT, Gartner ZJ. Organoid models for mammary gland dynamics and breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2020;66:51-8.
56. Shi R, Radulovich N, Ng C, Liu N, Notsuda H, Cabanero M, et al. Organoid cultures as preclinical models of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26:1162-74.
57. Li X, Francies HE, Secrier M, Perner J, Miremadi A, Galeano-Dalmau N, et al. Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics. *Nat Commun* 2018;9:2983.
58. Steele NG, Chakrabarti J, Wang J, Biesiada J, Holokai L, Chang J, et al. An Organoid-based preclinical model of human gastric cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019;7:161-84.
59. Sun XY, Ju XC, Li Y, Zeng PM, Wu J, Zhou YY, et al. Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions. *Elife* 2022;11:e76707.
60. Hedayat S, Cascione L, Cunningham D, Schirripa M, Lampis A, Hahne JC, et al. Circulating microRNA analysis in a prospective co-clinical trial identifies MIR652-3p as a response biomarker and driver of regorafenib resistance mechanisms in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2024;
61. Broguiere N, Isenmann L, Hirt C, Ringel T, Placzek S, Cavalli E, et al. Growth of epithelial organoids in a defined hydrogel. *Adv Mater* 2018;30:e1801621.
62. Yang R, Yu Y. Patient-derived organoids in translational oncology and drug screening. *Cancer Lett* 2023;562:216180.
63. Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, Shimokawa M, Ohta Y, et al. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. *Cell* 2018;174:856-869.e17.
64. Dijkstra KK, Monkhorst K, Schipper LJ, Hartemink KJ, Smit EF, Kaing S, et al. Challenges in Establishing Pure Lung Cancer Organoids Limit Their Utility for Personalized Medicine. *Cell Rep* 2020;31:107588.
65. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas)* 2019;56:15.
66. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther* 2021;221:107753.
67. Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol* 2016;40:41-8.
68. Jin MZ, Jin WL. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5:166.
69. Ho T, Msallam R. Tissues and tumor microenvironment (TME) in 3D: models to shed light on immunosuppression in cancer. *Cells* 2021;10:831.
70. Yuan J, Li X, Yu S. Cancer organoid co-culture model system: Novel approach to guide precision medicine. *Front Immunol* 2022;13:1061388.
71. Xia T, Du WL, Chen XY, Zhang YN. Organoid models of the tumor microenvironment and their applications. *J Cell Mol Med* 2021;25:5829-41.
72. Nunziato M, Di Maggio F, Pensabene M, Esposito MV, Starnone F, De Angelis C, et al. Multi-gene panel testing increases germline predisposing mutations' detection in a cohort of breast/ovarian cancer patients from Southern Italy. *Frontiers in Medicine* 2022;9:894358.
73. Esposito MV, Nunziato M, Starnone F, Telese A, Calabrese A, D'Aiuto G, et al. A Novel Pathogenic BRCA1 Splicing Variant Produces Partial Intron Retention in the Mature Messenger RNA. *Int J Mol Sci* 2016;17:2145.
74. Edgar RD, Perrone F, Foster AR, Payne F, Lewis S, Nayak KM, et al. Culture-Associated DNA Methylation changes impact on cellular function of human intestinal organoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;14:1295-310.
75. Giuffrida G, D'Argenio V, Ferrau F, Lasorsa VA, Polito F, Aliquò F, et al. Methylome Analysis in Nonfunctioning and GH-Secreting Pituitary Adenomas. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:841118.
76. Agarwal D, Kuhns R, Dimitriou CN, Barlow E, Wahlin KJ, Enke RA. Bulk RNA sequencing analysis of developing human induced pluripotent cell-derived retinal organoids. *Sci Data* 2022;9:759.
77. Wang R, Mao Y, Wang W, Zhou X, Wang W, Gao S, et al. Systematic evaluation of colorectal cancer organoid system by single-cell RNA-Seq analysis. *Genome Biol* 2022;23:106.
78. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, et al. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. *Cancer Discov* 2017;7:462-77.
79. Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, et al. A Patient-Derived Glioblastoma organoid model and biobank recapitulates inter- and intra-tumoral Heterogeneity. *Cell* 2020;180:188-204.e22.