

Ruolo dei fenomeni di trasporto nella crescita ed invasività tumorale

Rosalia Ferraro¹

¹Dipartimento di Chimica, dei Materiali e della Produzione Industriale (DICMAPI), Reottica, Università degli Studi di Napoli Federico II, P.le Tecchio, 80, 80125, Napoli, Italia.

Sommario

Il cancro è una malattia che deriva dal malfunzionamento delle cellule biologiche e rappresenta tuttora la seconda causa di morte nei paesi avanzati dopo le malattie cardiovascolari. Infatti, nel 2019 sono stati stimati oltre 17 milioni di nuovi casi di cancro e più di 9 milioni di morti in tutto il mondo.

Lo sviluppo di un modello *in-vitro* per descrivere come diversi fattori possano influenzare la risposta del tumore è fondamentale per migliorare i trattamenti e creare strategie per fornire ai pazienti una migliore aspettativa di vita. Motivo per cui, questo progetto di ricerca è focalizzato sullo sviluppo e sulla convalida di metodologie innovative per misurare il ruolo degli stimoli (-bio) meccanici esterni sulla capacità del tumore di invadere il tessuto sano circostante. Al tal fine, verrà sfruttata l'analogia tra tessuti ed emulsioni, introdotta nel 1963 da Steinberg con la *Differential Adhesion Hypothesis (DAH)*. Entrambi i sistemi, infatti, sono connotati da forze attrattive, tensione interfacciale e viscosità, ossia proprietà da cui dipende il comportamento del sistema cellulare, per i tessuti, e molecolare, per i liquidi.

La conoscenza di questi meccanismi può consentire di sviluppare modelli utili per la previsione e la progettazione della risposta tumorale a trattamenti terapeutici mirati.

Abstract

Cancer is a disease that arises from malfunctioning biological cells and it is still the second leading cause of death in advanced countries after cardiovascular disease. In fact, in 2019 more than 17 million new cases of cancer and more than 9 million deaths were estimated worldwide.

The development of an *in-vitro* model to describe how different factors can change the response of the tumour is crucial to improve treatments and create strategies to provide patients a better life expectation. For this reason, this research project is focused on the development and validation of innovative methodologies to measure the role of external (-bio) mechanical stimuli on the capacity of tumour to invade the surrounding healthy tissue.

To this end, the analogy between tissues and emulsions, introduced by Steinberg with the Differential Adhesion Hypothesis (DAH) in 1963, will be used. Both systems, in fact, are characterized by attractive forces, interfacial tension and viscosity, properties on which depends the behaviour of the cells, for tissues, and molecules, for liquids.

The knowledge of these mechanisms can allow to develop models applicable to the prediction and design of the response of a tumour to targeted therapeutic treatments.

Parole chiavi

Tumore, sferoidi, modelli *in-vitro*, tensione interfacciale, fluidi multifase, shear stress.

Keyword

Tumour, spheroids, *in-vitro models*, surface tension, multiphase fluids, shear stress.

1. Introduzione

Il cancro è una malattia complessa, eterogenea e multifattoriale, che continua a rappresentare uno dei principali problemi sanitari in tutto il mondo (The Cancer Atlas, January 2019). Infatti, rappresenta attualmente la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari, nei paesi avanzati.

In un tumore, le cellule malate proliferano in modo incontrollato, disturbando l'organizzazione dei tessuti. La sua invasività, che può essere indotta da stimoli esterni, sia chimici (chemiotassi (Vital-Lopez *et al.*, 2011; Hughes-Alford and Lauffenburger, 2012; Vasaturo *et al.*, 2012; Caserta *et al.*, 2013)) che meccanici, comporta anche la probabilità di migrazione delle cellule tumorali in altre parti del corpo attraverso un processo chiamato metastasi (Gassmann and Haier, 2008). Le metastasi rappresentano la causa predominante di morte nell'ambito del cancro, motivo per cui le cellule tumorali devono essere individuate il prima possibile.

L'obiettivo finale di questa ricerca è la dimostrazione sperimentale della teoria della instabilità diffusionale di un tumore (Cristini *et al.*, 2005; Bearer *et al.*, 2009; Cristini and Lowengrub, 2010), mediante la quantificazione della tensione corticale, parametro chiave per lo studio della sua invasività (Winters *et al.*, 2005; Hegedüs *et al.*, 2006), utilizzando le analogie con gli *inert soft condensed matter* (Steinberg, 1963; Burdett *et al.*, 2010; Palamidessi *et al.*, 2019). Già nel 1963 Steinberg, tramite la *Differential Adhesion Hypothesis (DAH)*, motivò il comportamento dei tessuti sfruttando l'analogia con i liquidi. Entrambi i sistemi, infatti, sono connotati da elementi più piccoli,

cellule e molecole, e descritti da proprietà quali le forze attrattive, tensione interfacciale e viscosità, che ne definiscono il comportamento. Tali analogie, consentiranno di analizzare la risposta morfologica del tumore, sottoposto ad uno stimolo meccanico, trattandolo come un'emulsione, facendo leva sul bilancio tra gli sforzi indotti dal flusso e quelli legati alle sollecitazioni interfacciali. Nel momento in cui viene meno l'equilibrio tra questi due termini, gli sforzi indotti possono provocare la deformazione e la frammentazione del tumore, portando alla formazione di metastasi.

Nello specifico, il nostro scopo è quello di ricavare la tensione corticale studiando l'effetto degli stimoli meccanici (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2012) sul modello tumorale 3D noto come sferoide (Leek *et al.*, 2016; Sant and Johnston, 2017). Gli sferoidi sono un aggregato cellulare strettamente connesse che tende a formarsi quando le cellule sono mantenute su un substrato che non ne consente l'adesione. Studiare l'invasività tumorale in modo quantitativo in un ambiente 3D in grado di imitare le condizioni *in-vivo* (definite anche *ex-vivo*) permetterebbe una migliore valutazione preclinica della risposta ad uno specifico farmaco antitumorale preso in considerazione, molto più affidabile e verosimile rispetto ai modelli 2D tipici della biologia cellulare, e più controllata rispetto ai modelli animali.

Al fine di applicare gli stimoli esterni sul tumore, gli sferoidi sono stati sottoposti ad un flusso di *shear*, utilizzando un dispositivo micro-fluidico. In particolare, gli sferoidi sono stati sospesi in un mezzo viscosizzato, formulato aggiungendo il polivinilpirrolidone (PVP) al mezzo di coltura standard, per aumentare la viscosità del fluido sospendente e, di conseguenza, minimizzare la velocità di sedimentazione degli sferoidi ed incrementare lo stress legato al flusso. In questo modo, analizzando la risposta morfologica dello sferoide allo stimolo esterno è possibile stimare gli sforzi di adesione che intercorrono tra le cellule, garantendo la compattezza dello sferoide. In particolare, questi sforzi sono legati ad una tensione superficiale "equivalente", definita anche tensione corticale (Blumlein *et al.*, 2017).

Nel nostro approccio, lo sferoide è considerato in analogia con una goccia in un'emulsione, dove gli sforzi legati al flusso possono indurre le gocce a deformarsi o a rompersi con meccanismi differenti, aumentando di conseguenza il rapporto superficie/volume. L'evoluzione di questi fenomeni è legata al bilancio tra gli sforzi indotti dal flusso e quelli legati alle sollecitazioni interfacciali, che vorrebbero imporre una forma sferica alle gocce. Analogamente, le interazioni cellula-cellula mantengono gli sferoidi compatti, mentre gli stimoli esterni (meccanici o chimici) possono indurre una

frammentazione degli sferoidi, che è il meccanismo alla base (Cristini *et al.*, 2005; Bearer *et al.*, 2009) del fenomeno di invasione tumorale, e della formazione delle metastasi.

1.1. Modelli tumorali

La ricerca biomedica è multidisciplinare e spesso utilizza approcci integrati composti da diversi modelli sperimentali. In generale, è possibile raggruppare i moderni paradigmi sperimentali impiegati in biologia e medicina in due categorie: modelli *in-silico* (Cristini and Lowengrub, 2010; Caserta *et al.*, 2019), basati su simulazioni numeriche, e modelli biologici, basati sull'uso di colture cellulari (*in-vitro*), organi isolati e perfusi (*ex vivo*).

Un obiettivo nella ricerca sul cancro è quello di studiare l'invasività tumorale in modo quantitativo in un ambiente 3D in grado di imitare le condizioni in vivo per ottimizzare la valutazione preclinica. La maggior parte dei modelli disponibili, e utilizzati, sono limitati a un approccio 2D, dove le cellule crescono e si evolvono in un monostrato. Questi modelli sono privi della maggior parte dei parametri considerati rilevanti, che sono presenti nel microambiente nativo delle cellule. Tra questi ci sono la matrice extracellulare (ECM), la presenza di segnali chimici legati alla diffusione di specifiche molecole nel fluido interstiziale, la stessa architettura 3D, legata a differenti parametri morfologici, e le interazioni con cellule stromali, ossia una popolazione di cellule progenitrici multipotenti in grado di auto-rinnovamento e differenziazione in linee cellulari mesodermiche (Friedl and Bröcker, 2000; Lämmermann *et al.*, 2008; Sixt and Lämmermann, 2011; Sant and Johnston, 2017).

Un modo per replicare meglio la complessità biologica legata al fenomeno della crescita tumorale è quello di studiare il cancro all'interno di un modello animale, in modo da non perdere i segnali del microambiente 3D che, invece, mancano nei modelli 2D. In questo modello, le cellule tumorali umane sono impiantate appena sotto la pelle di animali immunodeficienti. Dopo alcuni giorni o settimane, il tumore iniziale è cresciuto e, per esempio, viene somministrato un farmaco alle cavie. Durante il trattamento, la dimensione del tumore può essere monitorata facilmente. Purtroppo, poiché il microambiente 3D del tumore è di origine animale piuttosto che umana, il comportamento delle cellule tumorali potrebbe essere influenzato da tali cambiamenti (Sant and Johnston, 2017). Pertanto, indipendentemente da ogni considerazione di natura etica, i modelli animali non sempre rappresentano la migliore soluzione per uno studio scientifico di un fenomeno così complesso. È quindi necessario investire nella realizzazione di modelli che consentano di osservare l'evoluzione del sistema in laboratorio, in condizioni controllate, ma che riproducano gli elementi chiave della complessità presente in vivo.

Uno dei modelli 3D più utilizzati per studiare la crescita del cancro è lo sferoide tumorale. Gli sferoidi tumorali sono aggregati cellulari strettamente legati rappresentativi del cancro non vascolarizzato (Sant and Johnston, 2017), cioè nelle fasi iniziali della patologia. Comprendere il comportamento e l'aggressività della massa tumorale allo stato iniziale permette di definire un trattamento personalizzato al fine di evitare l'aggravamento della malattia. È importante, però, distinguere tra sferoidi e aggregati cellulari, che sono colture cellulari scarsamente aggregate in cui i gradienti di concentrazione sono carenti (Leek *et al.*, 2016). Al contrario, gli sferoidi mantengono il fenotipo funzionale delle cellule tumorali, in particolare le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extra-cellulare, gradienti di metaboliti e cataboliti e necrosi (Leek *et al.*, 2016). Negli sferoidi, i gradienti fisiologici e chimici (ad es. ossigeno, nutrienti e cataboliti) possono essere modellati ed esplorati in modo semplice. La presenza di tali gradienti chimici implica il ridotto contenuto di nutrienti vitali (O_2 e fattori di crescita solubili) e l'eccesso di cataboliti (CO_2 e scarti) provenienti dalle cellule circostanti, generando un core necrotico al centro dello sferoide. Il bordo dello sferoide, invece, è ricco di nutrienti e povero di cataboliti, per cui è caratterizzato da cellule sane, motivo per cui tale zona è nota come la zona di proliferazione (Li, 1982). La distanza radiale tra il core necrotico e la zona di proliferazione è nota come distanza di penetrazione, δ (Mehta *et al.*, 2012) ed è legata al rapporto tra il flusso e la generazione di metaboliti/cataboliti. I gradienti di concentrazione di queste sostanze inducono la migrazione delle cellule verso la fonte di nutrienti (vasi sanguigni). In conclusione, gli sferoidi rispecchiano in modo sorprendente il contesto cellulare 3D e i gradienti fisiopatologici terapeutamente rilevanti dei tumori *in-vivo*.

Oltre i modelli sperimentali, in tale ambito è possibile definire anche i modelli clinici che rappresentano l'ultimo step della ricerca. Tale step è il più preciso ma anche il più complesso, sia per motivi etici, sia per la complessità nell'interpretazione dei risultati che per la variabilità delle condizioni a causa di parametri non controllabili. Infatti, gli studi clinici richiedono la partecipazione di volontari – sani e malati – per sviluppare e analizzare trattamenti adatti alla prevenzione, alla diagnosi e alla cura delle malattie.

1.2. Analogia emulsione - tessuto

Le analogie con la *soft condensed matter* (liquidi viscoelastici, paste, schiume, emulsioni, colloidi e polimeri) possono essere utilizzate per studiare la risposta meccanica dei tessuti biologici agli stimoli meccanici.

Nel 1963, Steinberg propose l'ipotesi di adesione differenziale (DAH) per spiegare il comportamento dell'ordinamento cellulare attraverso un'analogia con il comportamento dei liquidi (Steinberg, 1963). Infatti, così come un liquido è formato da molecole che rimangono coesive a causa dell'esistenza di forze attrattive su scala molecolare, allo stesso modo un tessuto è formato da molte cellule che rimangono coesive per l'interazione cellula-cellula (Blumlein *et al.*, 2017).

In particolare, un tessuto può essere modellato come una goccia di liquido viscoelastico (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2012; Chugh and Paluch, 2018) connotato da una tensione superficiale (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2012), ossia la tendenza di un liquido a minimizzare la sua superficie totale, e una viscosità (Burdett *et al.*, 2010; Palamidessi *et al.*, 2019), ossia la resistenza del liquido alla deformazione. Nello specifico, per caratterizzare l'evoluzione dinamica di un tessuto sono necessari non solo parametri reologici ma anche condizioni di equilibrio a lungo termine. In effetti, un'ampia evidenza sperimentale indica che i tessuti si comportano come solidi elastici su brevi scale temporali (da secondi a minuti) perché la loro deformazione a breve termine è proporzionale allo sforzo applicato, per cui il tessuto recupera rapidamente la sua forma iniziale se lo sforzo viene rilasciato. Su scale di tempo più lunghe (da minuti ad ore), i tessuti subiscono riorganizzazioni cellulari che portano a deformazioni più persistenti, solitamente descritte sperimentalmente come un comportamento viscoelastico (Gonzalez-Rodriguez *et al.*, 2012).

2. Scopo del lavoro

L'obiettivo finale di questa ricerca è studiare l'invasività tumorale, dimostrando sperimentalmente la teoria della instabilità diffusionale, in modo quantitativo in un ambiente 3D, capace di imitare le condizioni *in-vivo* per ottimizzare la valutazione preclinica. A tal fine, verrà utilizzato un modello tumorale 3D, gli sferoidi, che verrà sottoposto a stimoli meccanici esterni per quantificarne la tensione corticale, utilizzando le analogie con gli *inert soft condensed matter*.

3. Dettagli sperimentali

3.1. Linee cellulari

Le cellule utilizzate per la realizzazione degli sferoidi sono state coltivate nel loro mezzo di coltura standard in un monostrato 2D (Flask T25) a 37°C in un'atmosfera umidificata (5% di CO₂). Sono state utilizzate due differenti tipi di linee cellulari: NIH/3T3 e PANC-1. La linea cellulare murina di NIH/3T3 e quella epiteliale umana di carcinoma da tessuto pancreatico, PANC-1, sono state coltivate in

Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) integrato con 10% (v/v) siero fetale bovino (FBS), 1% (v/v) antibiotici (50 unità/mL di penicillina e 50 mg/mL di streptomicina) e 1% (v/v) di L-glutammina.

3.2. Produzione sferoidi

È possibile preparare sferoidi in differenti modi (Achilli *et al.*, 2012) a seconda che l'obiettivo sia quello di produrre un gran numero di sferoidi o di produrre sferoidi di dimensioni uniformi (Leek *et al.*, 2016). Per il nostro progetto, è stato utilizzato il metodo che prevede l'impiego di *multi-well* con rivestimento in agarosio 1%. Tale menisco emisferico di agarosio, infatti, impedisce alle cellule di aderire alla superficie, favorendo invece l'interazione cellula-cellula. Con questa metodologia, gli sferoidi prodotti non solo sono uniformi tra loro ma rispecchiano più accuratamente il processo di crescita cellulare tridimensionale (Leek *et al.*, 2016).

Per la preparazione della soluzione, la polvere di agarosio è stata aggiunta all'acqua autoclavata utilizzando un piccolo beaker, rivestito di pellicola, a 200°C per 20'. La soluzione è stata mescolata mediante un'ancoretta su piastra calda. Successivamente, 200 µl della soluzione di agarosio sono stati rapidamente pipettati in ciascun pozzetto della piastra in condizioni sterili, per poi farlo raffreddare.

Per produrre gli sferoidi, le cellule sono state raccolte dalle Flask, contate e seminate ad una concentrazione di $2 \cdot 10^3$ cellule/ pozzetto. Di solito, alcune ottimizzazioni circa la concentrazione delle cellule sono necessarie prima che la produzione di sferoidi possa essere definita su larga scala (Zhang *et al.*, 2016). Successivamente, le cellule sono state ricoperte con il mezzo di coltura standard (3.1). La *multi-well* è stata incubata a 37°C. Per i primi giorni gli sferoidi sono stati lasciati indisturbati, in modo da evitare movimenti che potrebbero influenzare l'adesione cellulare e la formazione di sferoidi. Nei giorni successivi, la formazione e la crescita degli sferoidi sono state monitorate periodicamente. Tipicamente, sono necessari 5-10 giorni per ottenere sferoidi compatti e di dimensioni adeguate, ma tale periodo potrebbe essere influenzato anche dalla linea cellulare adottata.

4. Risultati

4.1. Misure reologiche

Al fine di ridurre la velocità di sedimentazione e di incrementare lo stress a cui sono sottoposti gli sferoidi, il mezzo di coltura standard è stato viscosizzato mediante l'aggiunta di PVP. La viscosità del PVP è stata investigata a differenti concentrazioni, quali il 6-10-20-30%w. Stime preliminari hanno suggerito che un valore di viscosità dell'ordine dei 10 Pa·s sarebbe ideale per ottimizzare la sedimentazione e le condizioni di flusso. Tale obiettivo non è banale, perché richiede di aumentare la viscosità del mezzo acquoso di circa 4 ordini di grandezza, mantenendone la biocompatibilità adatta a garantire la vitalità delle cellule, almeno su tempi di alcune ore.

La caratterizzazione reologica è stata condotta a temperatura ambiente utilizzando un reometro a *stress* controllato (*Anton Paar Physica MCR 301 Instruments*) con un piatto-cono (*CP75-1/TI/S-SN18730*). Nel dettaglio, sono state condotte delle misure a *shear stress* continuo imponendo uno *shear stress* compreso tra 0.55 [Pa] e 550 [Pa]. Le curve di flusso sono state ottenute registrando 30 punti di misure.

Dalla **Figura 1 (sinistra)**, si osserva che curve di flusso delle soluzioni di PVP mostrano un comportamento Newtoniano per basse concentrazioni (6 e 10%w) ed un lieve comportamento *shear thinning* per alte concentrazioni (20 e 30%w). Dato che il valore di viscosità di nostro interesse è circa pari a 10 [Pas] ed il valore di $\dot{\gamma}$ realizzato negli esperimenti di flusso prossimo ad 1 [1/s], potendo trascurare il comportamento non Newtoniano in tale intervallo, è stato selezionato il PVP al 20%w come fluido sospendente.

Sono state anche condotte prove in oscillatorio, riportate in **Figura 1 (destra)**.

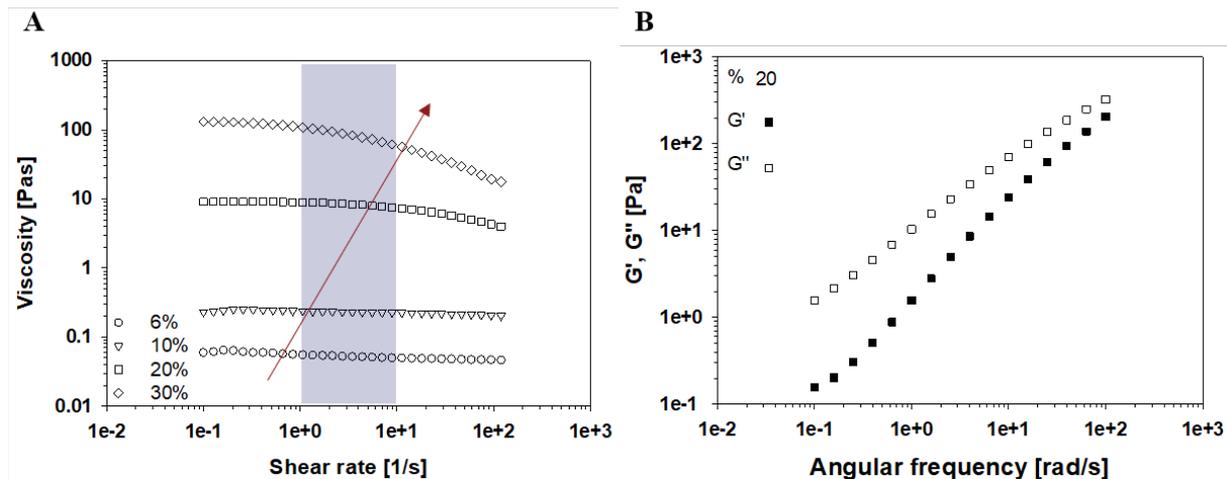


Figura 1. Viscosità della soluzione PVP - acqua distillata in funzione della shear rate a differenti concentrazioni in peso (sinistra). Modulo elastico (G') e viscoso (G'') in funzione della frequenza per la soluzione di PVP - acqua distillata al 20% (destra), con pendenze 0.80 e 1.1 per G' e G'' , rispettivamente.

3.2 Morfologia degli sferoidi in statico

I raggi degli sferoidi e del core necrotico di entrambe le linee cellulari sono stati analizzati utilizzando Image Pro Plus 6.0, sfruttando la variazione di scala di grigio delle immagini acquisite. Il raggio medio degli sferoidi NIH/3T3, di cui un'immagine rappresentativa è riportata nella figura **Figura 2A**, è di $186 \pm 3 \mu\text{m}$, mentre il raggio medio del core necrotico è di $48 \pm 2 \mu\text{m}$; al contrario, gli sferoidi PANC-1, riportati a titolo di esempio nell'immagine **Figura 2B**, sono più grandi, infatti, il raggio medio è di $347 \pm 14 \mu\text{m}$ e il raggio medio del nucleo è di $80 \pm 11 \mu\text{m}$. Per cui la zona di proliferazione, δ (**Figura 2C**), nel caso di sferoidi PANC-1 è maggiore rispetto all'altra linea cellulare, probabilmente ciò è dovuto alla loro natura tumorale. Tali informazioni relative alle dimensioni degli sferoidi, confrontate nella **Figura 2D**, risultano essenziali per la definizione del setup sperimentale, in quanto, in base dalla dimensione degli sferoidi, dipende la scelta del gap del canale micro-fluidico e, di conseguenza, la viscosità del mezzo sospendente da ottenere al fine di sottoporre lo sferoide ad un determinato stress.

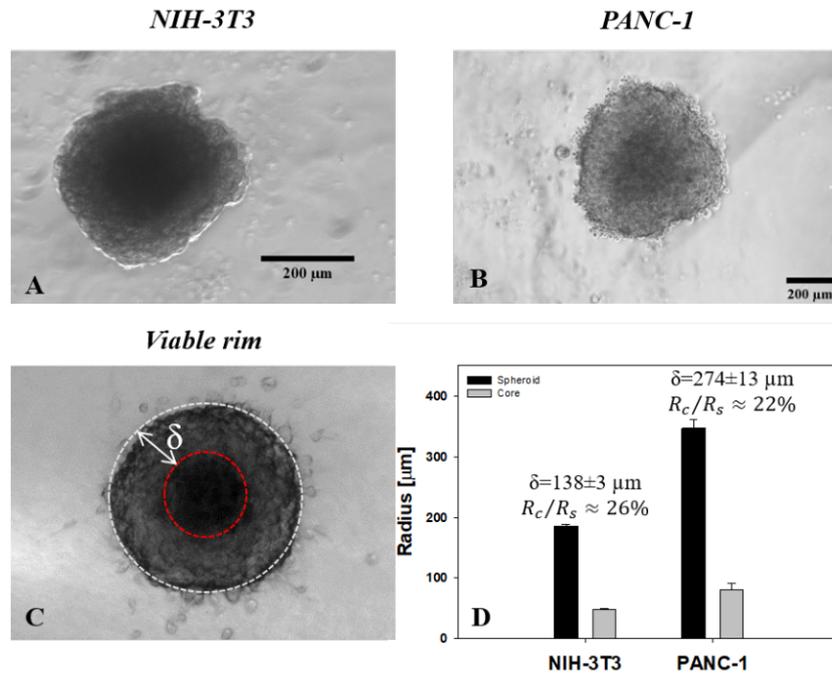


Figura 2. A-B) Immagine rappresentativa di uno sferoide di linea cellulare NIH/3T3 (sinistra) e PANC-1 (destra) acquisita con microscopio in contrasto di fase. Le immagini nel pannello sono relative ad un singolo campo di vista, assunto come rappresentativo, in termini qualitativi, della forma dello sferoide. **C)** Raggio dello sferoide e del core necrotico e, di conseguenza, della zona di proliferazione (δ , μm) analizzati in Image Pro Plus 6.0. **D)** Confronto tra le dimensioni degli sferoidi di NIH/3T3 e PANC-1 in termini di area e diametro dello sferoide e del core necrotico.

4.2. Setup sperimentale

Per effettuare un'analisi quantitativa dell'influenza dello shear sugli sferoidi, è stato utilizzato un apparato reo-ottico a piatti paralleli, connotato da un piatto mobile ed un piatto fisso che andranno a costituire le pareti vincolanti del canale micro-fluidico. In particolare, il piatto mobile può traslare con velocità controllata rispetto all'altro mediante uno stage motorizzato. Le immagini degli sferoidi in flusso sono state acquisite lungo la vista vorticità mediante microscopio ottico (Zeiss AxioScope). L'intero apparato è posizionato su una workstation isolata da vibrazioni tale da ridurre ogni disturbo meccanico.

La deformazione degli sferoidi sottoposti a flusso di *shear*, e di conseguenza la tensione interfacciale, è determinabile utilizzando il modello di Taylor, applicabile per gocce immerse in una matrice Newtoniana nel limite di piccole deformazioni e a bassi numeri di Reynolds (Re) (Taylor, 1932; 1934).

4.3. Analisi dei dati

La tensione interfacciale "equivalente" può essere calcolata dalla misura della deformazione (D) degli sferoidi, assimilati ad una goccia ellissoidale, utilizzando il modello di Taylor. Come è mostrato

nell'**Equazione 1**, la deformazione è quantificata dal parametro D, calcolato come il rapporto tra la differenza e la somma degli assi maggiore e minore (a e b, rispettivamente) di un'ellisse, che rappresenta la proiezione dello sferoide deformato nella direzione di osservazione (ovvero della vorticità). Per gocce isolate valore di D al primo ordine è una funzione del numero di capillare, Ca (**Equazione 2**), definito come il rapporto tra le forze viscosi e quelle interfacciali (**Equazione 3**). Negli esperimenti sono state imposte condizioni di flusso tali da avere un valore del numero di capillare atteso (calcolato cioè sulla base di valori tensione interfacciale stimati da letteratura) $Ca \approx 0.1 - 1$.

$$D = \frac{a - b}{a + b} \quad (1)$$

$$D = \frac{19\lambda + 16}{16\lambda + 16} Ca \quad (2)$$

$$Ca = \frac{\dot{\gamma} R_s \eta}{\sigma} \approx 0.1 - 1 \quad (3)$$

Il valore di D è stato misurato mediante tecniche di analisi delle immagini, utilizzando il software ImageProPlus, mentre il valore della *shear rate*, $\dot{\gamma}$ [1/s], è stato imposto, e calcolato dal rapporto della velocità del piatto mobile (v), nota, e il gap tra i due piatti, quello fisso e quello mobile.

Immagini rappresentative di sferoidi sottoposti a flusso di shear sono riportate nella **Figura 3**:

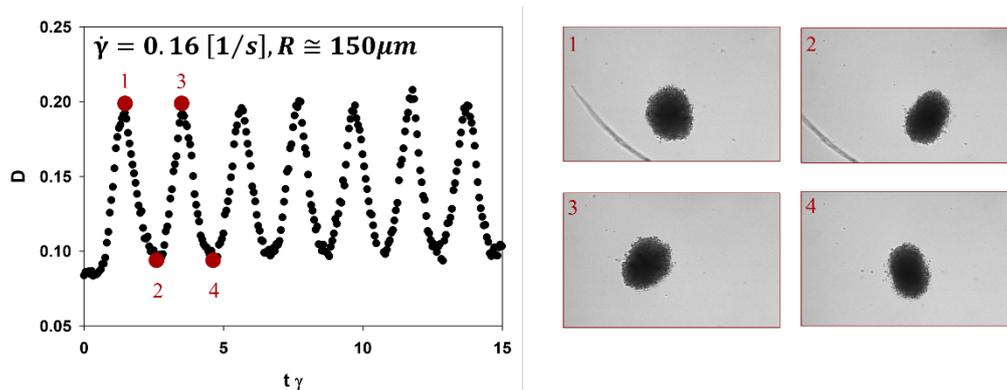


Figura 3. Parametro di deformazione vs $t\dot{\gamma}$, ossia il prodotto tra tempo e shear rate (sinistra). Si può osservare un andamento oscillatorio del parametro, dovuto alla rotazione dello sferoide intorno all'asse maggiore, come confermato qualitativamente dalle immagini (destra).

Andando a plottare il parametro D contro il tempo adimensionalizzato mediante $\dot{\gamma}$, è stato osservato che sferoidi connotati da un diametro non molto grande mostrano un andamento oscillatorio come se lo sferoide ruotasse su se stesso piuttosto che deformarsi (**Figura 3**). Questo comportamento è del tutto analogo a quello osservato nel caso di vescicole multilamellari, ossia un sistema costituito

da molecole di surfattante (Pommella *et al.*, 2012), andando pertanto a sottolineare l'effettiva analogia tra i due sistemi, tessuti ed emulsioni.

Sulla base di questi incoraggianti risultati preliminari, è tuttora in corso una campagna sperimentale estesa, volta all'osservazione sistematica del fenomeno, al fine di applicare la metodologia a misure quantitative della tensione interfacciale. A tal fine il protocollo è anche oggetto di miglioramenti e modifiche. La prima modifica da effettuare sarebbe quello di incrementare il tempo di osservazione in modo da osservare risposte più significative in termini di deformazione, così da poter estrapolare il valore della tensione corticale della singola linea cellulare andando a relazionare D con il gruppo $\dot{\gamma}R_s\eta$.

5. Conclusioni

In questo lavoro, è stata definita una metodologia sperimentale innovativa per la caratterizzazione degli sferoidi tumorali. La ricerca è basata sulla analogia tra il comportamento meccanico di tessuti cellulari e quello di fluidi multifase. L'evoluzione dinamica degli sferoidi tumorali è descritta dalla teoria dell'instabilità diffusionale, che prevede la risposta dei sistemi cellulari a stimoli esterni. Nel nostro lavoro è stato in particolare proposto un setup sperimentale che consenta di investigare la risposta morfologica di sferoidi tumorali sottoposti a stimoli meccanici esterni. Gli sferoidi tumorali sono sospesi nel loro mezzo di coltura standard viscosizzato con PVP. Mediante un apparato reo-ottico a piatti paralleli è possibile applicare un flusso di *shear* controllato. La quantificazione della risposta morfologica, e di conseguenza della tensione corticale, viene condotta mediante l'utilizzo del modello di Taylor. Mediante la valutazione della deformazione in funzione della *shear rate*, noto il numero di capillare, è possibile valutare la tensione interfacciale equivalente, sfruttando l'analogia tra tessuti e liquidi.

6. Ringraziamenti

Il lavoro è stato sviluppato grazie al supporto economico dell'Associazione Italiana di Reologia SIR che ha finanziato una borsa di studio, svolta presso il Dipartimento di Ingegneria Chimica, dei Materiali e della Produzione Industriale nel gruppo di ricerca del Prof. Sergio Caserta. I risultati del lavoro sono stati presentati al convegno AERC 2021. Il poster intitolato "*Role of flow-induced stress in cancer growth and invasion*" è stato premiato come *The Best Scientific Poster Award* (sponsorizzato da Anton Paar). Gli sviluppi successivi del lavoro, svolto durante la borsa di studio SIR, hanno consentito di definire un progetto di dottorato, interamente focalizzato sull'applicazione

sistematica delle metodologie sperimentali sviluppate durante la borsa di studio, e presentate in questo lavoro.

Bibliografia

ACHILLI, T.-M.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert opinion on biological therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347-1360, 2012. ISSN 1471-2598.

BEARER, E. L. et al. Multiparameter Computational Modeling of Tumor Invasion. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4493, 2009. Available at: < <http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/10/4493.abstract> >.

BLUMLEIN, A.; WILLIAMS, N.; MCMANUS, J. J. The mechanical properties of individual cell spheroids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7346, 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07813-5> >.

BURDETT, E. et al. Engineering Tumors: A Tissue Engineering Perspective in Cancer Biology. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, n. 3, p. 351-359, 2010/01/16 2010. ISSN 1937-3368. Available at: < <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0676> >.

CASERTA, S. et al. A methodology to study chemotaxis in 3-D collagen gels. **AIChE Journal**, v. 59, n. 11, p. 4025-4035, 2019/01/16 2013. ISSN 0001-1541. Available at: < <https://doi.org/10.1002/aic.14164> >.

_____. **A trans-disciplinary approach to cancer research** 2019.

CHUGH, P.; PALUCH, E. K. The actin cortex at a glance. **Journal of cell science**, v. 131, n. 14, p. jcs186254, 2018. ISSN 0021-9533.

CRISTINI, V. et al. Morphologic Instability and Cancer Invasion. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 19, p. 6772, 2005. Available at: < <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/19/6772.abstract> >.

CRISTINI, V.; LOWENGRUB, J. **Multiscale modeling of cancer: an integrated experimental and mathematical modeling approach**. Cambridge University Press, 2010. ISBN 1139491504.

FRIEDL, P.; BRÖCKER, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cellular and molecular life sciences CMLS**, v. 57, n. 1, p. 41-64, 2000. ISSN 1420-682X.

GASSMANN, P.; HAIER, J. The tumor cell–host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 2, p. 171-181, 2008. ISSN 0262-0898.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, D. et al. Soft matter models of developing tissues and tumors. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 910-917, 2012. ISSN 0036-8075.

HEGEDÜS, B. et al. The interplay of cell-cell and cell-matrix interactions in the invasive properties of brain tumors. **Biophysical journal**, v. 91, n. 7, p. 2708-2716, 2006. ISSN 0006-3495.

HUGHES-ALFORD, S. K.; LAUFFENBURGER, D. A. Quantitative analysis of gradient sensing: towards building predictive models of chemotaxis in cancer. **Current opinion in cell biology**, v. 24, n. 2, p. 284-291, 2012. ISSN 0955-0674.

LEEK, R. et al. Methods: using three-dimensional culture (spheroids) as an in vitro model of tumour hypoxia. In: (Ed.). **Tumor microenvironment**: Springer, 2016. p.167-196.

LI, C. K. N. The glucose distribution in 9L rat brain multicell tumor spheroids and its effect on cell necrosis. **cancer**, v. 50, n. 10, p. 2066-2073, 1982. ISSN 0008-543X.

LÄMMERMANN, T. et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 51-55, 2008. ISSN 1476-4687.

MEHTA, G. et al. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. **Journal of controlled release**, v. 164, n. 2, p. 192-204, 2012. ISSN 0168-3659.

PALAMIDESSI, A. et al. Unjamming overcomes kinetic and proliferation arrest in terminally differentiated cells and promotes collective motility of carcinoma. **Nature materials**, p. 1-12, 2019. ISSN 1476-4660.

POMMELLA, A. et al. Shear-Induced Deformation of Surfactant Multilamellar Vesicles. **Physical Review Letters**, v. 108, n. 13, p. 138301, 2012. Available at: <
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.108.138301>>.

SANT, S.; JOHNSTON, P. A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 27-36, 2017. ISSN 1740-6749.

SIXT, M.; LÄMMERMANN, T. In vitro analysis of chemotactic leukocyte migration in 3D environments. In: (Ed.). **Cell Migration**: Springer, 2011. p.149-165.

STEINBERG, M. S. Reconstruction of tissues by dissociated cells. **Science**, v. 141, n. 3579, p. 401-408, 1963. ISSN 0036-8075.

TAYLOR, G. I. The viscosity of a fluid containing small drops of another fluid. **Proc. R. Soc. Lond. A**, v. 138, n. 834, p. 41-48, 1932. ISSN 0950-1207.

_____. The formation of emulsions in definable fields of flow. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A, containing papers of a mathematical and physical character**, v. 146, n. 858, p. 501-523, 1934. ISSN 0950-1207.

The Cancer Atlas. 3rd Edition. International Agency for Research on Cancer, January 2019. ISBN 978-1-60443-265-7.

VASATURO, A. et al. A Novel Chemotaxis Assay in 3-D Collagen Gels by Time-Lapse Microscopy. **Plos one**, v. 7, n. 12, p. e52251, 2012. Available at: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052251> >.

VITAL-LOPEZ, F. G. et al. Modeling the effect of chemotaxis on glioblastoma tumor progression. **AIChE journal**, v. 57, n. 3, p. 778-792, 2011. ISSN 0001-1541.

WINTERS, B. S.; SHEPARD, S. R.; FOTY, R. A. Biophysical measurement of brain tumor cohesion. **International journal of cancer**, v. 114, n. 3, p. 371-379, 2005. ISSN 0020-7136.

ZHANG, W. et al. Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. **Analytical biochemistry**, v. 515, p. 47-54, 2016. ISSN 0003-2697.