



UNIVERSITA' DI FOGGIA
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Tesi di Dottorato di Ricerca
“*Scienze e tecnologie biomediche*”
XXV Ciclo

LE CANCER STEM CELLS NEI TUMORI
DELLA REGIONE TESTA-COLLO:
STUDIO *IN VITRO* ED *IN VIVO* DELLA
LINEA CELLULARE HEP2.

Dottoranda
Donatella Perrone

Relatore
Chiar.mo Prof. *Lorenzo Lo Muzio*

Coordinatrice
Chiar.ma Prof.ssa *Luigia Trabace*

Triennio 2010-2013

INDICE

<i>1 INTRODUZIONE</i>	<i>7</i>
<i>1.1 Cellule staminali</i>	<i>7</i>
<i>1.1.1 Definizione</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Ciclo cellulare</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3 Classificazione delle cellule staminali</i>	<i>10</i>
<i>1.1.4 Marcatori delle cellule staminali</i>	<i>12</i>
<i>1.2 Cellule Staminali Tumorali</i>	<i>14</i>
<i>1.2.1 Caratteristiche delle CSC</i>	<i>19</i>
<i>1.2.2 Identificazione delle CSC</i>	<i>19</i>
<i>1.2.2.1 Antigeni di superficie</i>	<i>20</i>
<i>1.2.2.2 Side population</i>	<i>21</i>
<i>1.2.2.3 Attività dell'aldeide deidrogenasi</i>	<i>23</i>
<i>1.2.2.4 Formazione di sfere</i>	<i>23</i>
<i>1.2.3 Prospettive nella terapia del cancro</i>	<i>24</i>
<i>1.3 Carcinoma della laringe</i>	<i>27</i>
<i>1.3.1 Epidemiologia e fattori di rischio</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2 Morfologia e sede di insorgenza</i>	<i>28</i>

1.3.3 Sintomatologia	29
1.3.4 Stadiazione	30
1.3.5 Diagnosi	32
1.3.6 Approccio terapeutico	33
1.3.7 Prognosi	34
1.4 SCOPO DEL LAVORO	35
2 MATERIALI E METODI	37
2.1 Caratterizzazione delle linee cellulari	37
2.1.1 Colture cellulari	37
2.1.2 Test di vitalità cellulare	38
2.1.3 Cell Sorting Magnetico e citometria a flusso	39
2.1.4 Espressione di CD133 nella linea KB mediante analisi con citometria a flusso	41
2.1.5 Analisi di tumorigenicità in vivo	42
2.1.6 Analisi immunocitochimica	44
2.2 Analisi della linea cellulare Hep-2	46
2.2.1 Arricchimento delle Hep-2 in CSCs	46
2.2.2 Analisi immunocitochimica	47
2.2.3 Real time PCR	47
2.2.4 Analisi dell'attività enzimatica NNMT	51
2.2.5 Test di tumorigenicità in vivo	52
2.2.6 Analisi istologica	53

2.2.7 <i>Analisi Immunoistochimica</i>	54
2.2.8 <i>Real-time PCR</i>	55
3 RISULTATI	56
3.1 <i>Caratterizzazione delle linee cellulari</i>	56
3.1.1 <i>Espressione di CD133 nella linea KB e separazione magnetica</i>	56
3.1.2 <i>Test di vitalità cellulare</i>	58
3.1.2 <i>Test di tumorigenicità in vivo</i>	59
3.1.3 <i>Analisi immunocitochimica delle linee cellulari</i>	60
3.2 <i>Arricchimento e caratterizzazione delle CSCs in Hep-2</i>	61
3.2.1 <i>Cellule formanti sfere</i>	61
3.2.2 <i>Analisi immunocitochimica</i>	62
3.2.3 <i>Real-Time PCR</i>	63
3.2.4 <i>Analisi dell'espressione di NNMT</i>	64
3.2.5 <i>Test di tumorigenicità in vivo</i>	65
3.2.6 <i>Analisi istologica</i>	66
3.2.7 <i>Analisi Immunoistochimica</i>	67
3.2.8 <i>Analisi di Real-Time PCR</i>	68
4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	70
5 BIBLIOGRAFIA	76
6 ABBREVIAZIONI	83

1 INTRODUZIONE

1.1 CELLULE STAMINALI

1.1.1 Definizione

Le cellule staminali danno origine a tutte le cellule differenziate di un organismo adulto e possono essere toti-, multi- o pluripotenti a seconda dello stadio di sviluppo in cui si trovano. Sono presenti nel corpo di un organismo adulto, nel cordone ombelicale, nel feto e nell'embrione in fase di blastocisti.

Le cellule staminali hanno la capacità di replicare se stesse (autorinnovamento) durante tutta la loro vita, generando molteplici tipologie di cellule figlie (multipotenza), e di rigenerare il sistema d'organo nel quale risiedono (ricostituzione). Queste tre caratteristiche costituiscono i principali criteri di riferimento per distinguere le cellule staminali da altri tipi di cellule proliferanti.

L'autorinnovamento (o selfrenewal) è garantito da un'elevata attività telomerasica, caratteristica in grado di mantenere costante la lunghezza dei telomeri dopo ogni divisione cellulare. Le cellule staminali, pertanto, non perdono il proprio potenziale di replicazione e mantengono il medesimo stadio differenziativo.

La cellula staminale può andare incontro ad autorinnovamento, mediante una divisione asimmetrica, dando origine ad una cellula staminale e ad una cellula destinata a differenziarsi, oppure mediante una divisione simmetrica. Nel secondo caso la popolazione di cellule staminali si conserva poiché esiste un numero pressoché uguale di cellule staminali che generano altre due staminali e cellule staminali che generano due cellule destinate a differenziarsi.

La multipotenza è la capacità della cellula staminale di dare origine a una o più linee o tipi cellulari tramite il differenziamento. A tale concetto si affianca quello di transdifferenziamento, ovvero la capacità di una cellula staminale in fase di differenziamento di cambiare la tipologia di linea cellulare in cui si sta differenziando, modificando il proprio programma di sviluppo

1.1.2 Ciclo cellulare

All'interno dei tessuti normali, le cellule staminali costituiscono una sottopopolazione dotata di intensa attività proliferativa. Tuttavia le cellule staminali si trovano normalmente in uno stato di quiescenza (ciclo cellulare in fase G0) e l'attività proliferativa viene innescata e modulata in funzione delle esigenze del tessuto di appartenenza. Una cellula staminale di uno specifico tessuto tende a non esibire alcuna delle proprietà morfologiche, strutturali e molecolari tipiche delle cellule differenziate relative al tessuto di origine e inoltre è in grado di rigenerarsi all'infinito.

Come descritto in precedenza, dalla divisione di una cellula staminale possono derivare due cellule figlie che, a seconda dei casi, saranno soggette ad un destino uguale o diverso. Nella divisione simmetrica le due cellule figlie seguono lo stesso destino, ossia o rimangono entrambe cellule staminali, come la loro progenitrice (questa modalità di espansione è definita divisione espansiva, poiché è destinata ad aumentare le dimensioni della popolazione di cellule staminali) oppure le due cellule figlie sono dette "*committed*", in quanto imboccano entrambe la via del differenziamento funzionale (in questo caso si parla di divisione differenziativa) .

La regolazione di tali processi è molto complessa e raffinata, poiché non si attua a livello delle singole cellule, bensì sull'intera popolazione cellulare costituente il tessuto.

Nella divisione asimmetrica, le cellule figlie, che derivano da una cellula staminale, assumono caratteristiche differenti:

- una cellula figlia conserva intatto il carattere di cellula staminale;
- l'altra cellula figlia assume tutte le caratteristiche strutturali e funzionali del tessuto di appartenenza, andando incontro al processo di differenziamento.

Questa strategia riproduttiva garantisce la conservazione del numero di cellule staminali che popola il tessuto, poiché ogni cellula che dividendosi cessa di esistere è sostituita da una delle sue cellule figlie, e la produzione di un numero elevato di cellule differenziate. Fisiologicamente è molto importante che venga mantenuto costante il numero di cellule staminali e, fatta eccezione per la fase di espansione, che si ha nell'embriogenesi, e per la fase di riparazione di gravi danni ai tessuti, è proprio la divisione asimmetrica delle cellule staminali a permettere che ciò avvenga .

I pathways molecolari delle cellule staminali sono regolati geneticamente ed epigeneticamente e l'equilibrio tra divisione espansiva e proliferativa è influenzato da fattori intrinseci ed estrinseci. Tra i fattori intrinseci vi è senz'altro l'alta attività telomerasica. I fattori estrinseci, invece, dipendono dal microambiente, dalla "nicchia" in cui le staminali si trovano. Tra questi sono di particolare rilievo i fattori della famiglia di Wnt, TGF- β , Notch, Shh, BMI-1 e le integrine e β -catenine, responsabili dei meccanismi di comunicazione tra le cellule.

1.1.3 Classificazione delle cellule staminali

Uno dei principali criteri per classificare le cellule staminali si basa sulla provenienza. Le cellule staminali “*embrionali*” derivano da una fase molto precoce dello sviluppo embrionale: la blastocisti. Per tale ragione esse mantengono la capacità di generare qualsiasi altra specie cellulare e la loro prima caratteristica è la pluripotenza. Durante lo sviluppo dell’organismo, le cellule staminali embrionali generano cellule progressivamente più differenziate, tra cui le cellule staminali tessuto-specifiche dette anche somatiche. Queste generano cellule mature del tessuto in cui risiedono partecipando al suo accrescimento. Al termine dello sviluppo il numero di cellule somatiche declina gradualmente e si stabilizza sui valori riscontrabili nell’età adulta. Le cellule staminali “*adulte*” o “*somatiche*” sono cellule non specializzate, reperibili tra le cellule specializzate di uno specifico tessuto e sono prevalentemente *multipotenti* e *unipotenti*.

Tra le cellule staminali adulte sono comprese anche le staminali fetali (*Fetal Stem Cells, FSCs*), presenti negli abbozzi degli organi fetali, e le staminali neonatali (*Neonatal Stem Cells, NSCs*), isolabili dal cordone ombelicale e dal liquido amniotico.

La maggior parte delle cellule staminali adulte sono confinate all’interno di un comparto, denominato nicchia . Si definisce nicchia il microambiente che consente alle cellule staminali di intraprendere la scissione cellulare asimmetrica, producendo cellule che perpetuano la cellula staminale e cellule che vanno incontro alla differenziazione, prima dando origine a cellule amplificanti transitorie (TA) e poi a cellule terminalmente differenziate . Questo processo sembra essere regolato dalla presenza di fattori di differenziazione, di crescita, di recettori trans-membrana e segnali molecolari intrinseci

ed estrinseci al microambiente. La capacità dell'organismo umano di sostituire le cellule danneggiate, al fine di conservare la sua integrità, è affidata alle cellule staminali.

Oltre a distinguersi in funzione del loro sito di origine, le cellule staminali possono essere classificate anche in base al potenziale di differenziazione. Le cellule staminali possono essere classificate in totipotenti, pluripotenti, multipotenti e unipotenti.

Le cellule staminali *totipotenti* (chiamate anche blastomeri) costituiscono l'embrione nel suo stato più precoce (da due a sedici cellule) e sono in grado di generare l'organismo e i tessuti extra-embryonali.

Le cellule staminali *pluripotenti* sono le cellule embrionali che costituiscono la massa interna della blastocisti. È possibile isolarle e mantenerle in coltura per un periodo indefinito e possono dare origine a un embrione completo; tuttavia non sono in grado di generare tessuti extra-embryonali.

Le cellule staminali *multipotenti* rappresentano le cellule derivate da uno dei foglietti embrionali e sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi cellulari. Infine, le cellule staminali *unipotenti* possono generare un solo tipo di cellula e quindi dar luogo solo ad uno specifico tessuto .

1.1.4 Marcatori delle cellule staminali

Le cellule staminali sono principalmente identificate ed isolate mediante specifici marcatori di superficie. Numerosi studi fenotipici, su diverse popolazioni cellulari formate

da cellule progenitrici e primitive, hanno, infatti, evidenziato la formazione di *cluster di differenziazione* sulla superficie delle cellule staminali.

Il primo marcatore individuato è stato il CD34, una glicoproteina transmembrana, espressa sulle cellule staminali ematopoietiche, su cellule vascolari endoteliali e sui fibroblasti embrionali. Nel tessuto nervoso adulto, è stato dimostrato che la coespressione di CD34 e CD90 (o Thy-1) identifica un subset di cellule del midollo osseo fetale umano, che fungono da progenitori ematopoietici multipotenti e che *in vivo* hanno un alto tasso di proliferazione. È spesso associato con l'antigene CD34 il CD133, una glicoproteina di superficie presente in cellule staminali neuronali fetali, cellule staminali della cornea, del rene e della prostata.

Altri marcatori più comunemente associati al fenotipo staminale sono:

- CD44, molecola di adesione contenente sei potenziali siti di N-glicosilazione. Viene espressa in cellule epiteliali, muscolari, in diverse cellule ematopoietiche e nei fibroblasti
- CD29, integrina β -1 coinvolta nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare.
- CD24, coinvolto nella maturazione e proliferazione cellulare, espresso sui linfociti B e granulociti
- CD117, recettore tirosin-chinasico di tipo III il cui ligando è una tirosina detta *stem cell factor* (SCF)
- Oct3-4 e Nanog, fattori trascrizionali espressi da cellule staminali embrionali coinvolti nei processi di selfrenewal e conservazione della pluripotenza.

1.2 CELLULE STAMINALI TUMORALI

I tumori primitivi sono responsabili solo del 10% dei decessi nei soggetti colpiti; nella restante parte dei casi, la principale causa di mortalità e morbilità è la formazione di metastasi in siti distanti dal tessuto in cui si trova il tumore primitivo. I meccanismi che sottendono l'insorgenza del tumore sono ampiamente studiati, ma ad oggi non si ha ancora una comprensione esaustiva e completa in merito.

La visione della formazione e dello sviluppo del tumore è diventata via via più complessa. Il tumore, infatti, non viene più visto come una massa omogenea di cellule proliferanti, ciascuna avente identiche alterazioni genetiche, ma ad oggi viene visto come un aberrante tessuto eterogeneo contenente una gerarchia di cellule che ha origine da una singola cellula tumorale e tumorigenica. Il persistere del tumore dipende anche da un compartimento di cellule stromali, dal microambiente tumorale e da una nicchia che alimenta la crescita di cellule tumorali .

In passato, è stato ipotizzato che l'eterogeneità delle cellule tumorali fosse legata ad un accumulo stocastico di numerose e diverse mutazioni individuali e alla formazione di un microambiente favorevole allo sviluppo delle cellule tumorali, secondo un modello noto come clonale o stocastico .

Negli ultimi quindici anni, invece, si è sviluppata una nuova ipotesi, in cui si suppone che solo una frazione numericamente esigua di cellule sia responsabile della formazione e dello sviluppo del tumore e di metastasi. Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che tali cellule abbiano caratteristiche di autorinnovamento, multipotenzialità e conservazione dello stato indifferenziato, e siano dunque la controparte patologica delle cellule staminali adulte, dette appunto cellule staminali tumorali o CSCs (*Cancer Stem Cells*) .

Le mutazioni a carico delle cellule staminali sono estremamente pericolose, poiché vengono trasmesse a tutte le generazioni di cellule figlie derivate dalla stessa cellula staminale. Al contrario, una mutazione in una cellula progenitrice non staminale si ripercuote solo su di una singola generazione di cellule che, dopo un certo tempo, verrà comunque sostituita. Alterazioni a carico di una cellula staminale possono indurre degenerazione in senso neoplastico. In seguito a tale evento, si genera una cellula staminale tumorale, potenzialmente responsabile del continuo rifornimento di nuove cellule tumorali che caratterizza lo sviluppo e soprattutto le recidive del tumore. Il tumore risulta pertanto costituito per la maggior parte da cellule differenziate e capaci di proliferare solo in maniera limitata e da una piccola frazione di cellule caratterizzate da un grande potenziale proliferativo ed in grado di mantenere il tumore.

Queste cellule sono rare, quiescenti, possiedono capacità di self-renewal e sono la causa dell'eterogeneità di tipi di cellule tumorali che formano l'intera massa tumorale (Figura 1). Molti studi sono volti poi a definire l'origine di tali cellule e sono state avanzate diverse ipotesi: potrebbero derivare da cellule staminali con fenotipo tumorale, oppure da progenitori precedentemente differenziati con mutazioni in particolari oncogeni, oppure da rari eventi di fusione di cellule staminali con altre cellule.

Il grande vantaggio dell'ipotesi delle CSCs è che ci aiuta a spiegare e comprendere tutte le fasi della trasformazione neoplastica e la malattia minima residua.

Figura 1a:

All'incirca centocinquanta anni fa, il patologo tedesco Rudolf Virchow propose che l'insorgenza del tumore dipendesse da cellule immature, mentre i ricercatori di John Gurdon e Shinya Yamanaka hanno identificato per la prima volta le CSCs. La teoria delle CSCs propone un'organizzazione gerarchica, in cui le cellule staminali (SC) endogene o dal riprogrammamento delle TA o dalle cellule del tessuto differenziate (Diff)

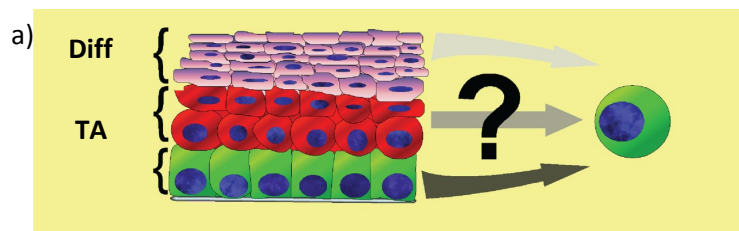
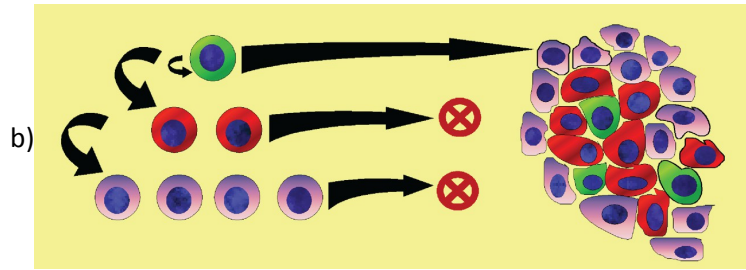


Figura 1b:

la teoria delle CSCs propone un'organizzazione gerarchica, in cui le cellule staminali



Questi ha dimostrato che nella leucemia mieloide acuta umana (AML) solo alcune cellule fortemente maligne avevano la capacità di rigenerare il tumore in seguito a trapianto, implicando quindi sia la capacità di differenziamento sia quella di self-renewal e che queste ultime erano $CD34^+$ e $CD38^-$. In seguito popolazioni biologicamente distinte e rare di cellule "inizianti" il tumore sono state identificate oltre che in tumori del sistema ematopoietico anche in alcuni tumori solidi. Gli studi in quest'ultimo caso sono stati molto più difficoltosi; non si può, infatti, tralasciare, la forte eterogeneità che caratterizza il microambiente dei tumori solidi (costituito sia da cellule tumorali che normali e elementi vascolari in una matrice extracellulare complessa) così come non si può trascurare che l'identificazione delle cellule staminali avviene attraverso una massa solida, in cui non tutte le cellule sono tumorali.

Solo nel 2003 Al-Hajj et al. hanno identificato ed isolato per la prima volta le CSCs in tumori solidi, in particolare in tumori alla mammella, usando come markers il CD44 e il CD24. Da allora si sono succeduti diversi e molteplici studi volti all'isolamento delle CSCs

nei diversi tipi di tumori solidi, come il glioblastoma , melanoma , osteosarcoma , condrosarcoma , cancro della prostata , cancro alle ovaie , tumore allo stomaco e al polmone .

In tabella si riportano i marcatori più diffusi per i principali tumori solidi.

TIPO DI TUMORE	Markers CSC
Cancro della mammella	CD44 ⁺ , CD24 ⁻ , Sfere
Glioblastoma	CD133 ⁺ , sfere
Melanoma	CD20 ⁺ , sfere
Cancro della Prostata	CD133 ⁺ CD44 ⁺ , Sfere
Cancro delle ovaie	SP ⁺ , sfere
Cancro dello stomaco	CD44 ⁺ , SP ⁺
Cancro del fegato	CD133 ⁺ , SP ⁺ , sfere
HNSCC	CD44 ⁺ , SP ⁺
Osteosarcoma	CD133 ⁺ , CD117 ⁺ , Stro-1 ⁺ , SP ⁺ , ALDH ⁺ , sfere
Sarcoma sinoviale	CD133 ⁺
Condrosarcoma	CD133 ⁺ , SP ⁺ , sfere
Sarcoma di Ewing	CD133 ⁺ , ALDH ⁺
Mesenchimali	SP ⁺

Tabella1. Fenotipi di CSC nei tumori solidi umani

L'esistenza delle cancer stem cells sostiene l'ipotesi secondo la quale i tumori sarebbero organizzati in modo gerarchico a partire dalle cellule staminali tumorali ad elevato potenziale replicativo fino a cellule tumorali più differenziate e con un limitato potenziale replicativo.

Come precedentemente descritto, è possibile che le cellule staminali tumorali derivino da cellule staminali normali che sono andate incontro a mutazioni. Altre tesi sostengono invece che le cellule staminali tumorali potrebbero originare in seguito a mutazioni a carico di cellule progenitrici non staminali.

Tali progenitori, detti anche “transit amplifying cells”, possiedono una certa capacità replicativa ma non sono in grado di autorinnovarsi. Pertanto per essere convertita in cellula staminale tumorale, un progenitore deve andare incontro a specifiche mutazioni in grado di fargli acquisire la capacità di autorinnovamento .

Secondo la teoria delle cancer stem cells, la crescita del tumore sarebbe promossa e mantenuta da una esigua popolazione di cellule staminali caratterizzate da un elevato potenziale proliferativo e dotate di capacità di autorinnovamento. Le cancer stem cells si trovano normalmente in uno stato di quiescenza. Per tale ragione sono in grado di resistere ai convenzionali trattamenti chemioterapici diretti contro le cellule in attiva proliferazione e costituiscono una popolazione cellulare responsabile della formazione di recidive e di metastasi a distanza. Le cellule staminali tumorali si comportano come le normali cellule staminali, tranne per il fatto di aver perso il normale equilibrio omeostatico tra autorinnovamento e differenziazione .

1.2.1 Caratteristiche delle CSC

Le proprietà biologiche delle CSCs, la loro rilevanza nelle terapie contro il cancro e le metodologie per identificarle sono essenziali per eradicare il cancro sviluppando strategie terapeutiche sempre più efficaci. Le cellule staminali tumorali possiedono specifiche proprietà.

- L'*autorinnovamento* consente il mantenimento di almeno una progenie con lo stesso potenziale di sviluppo.
- La *differenziazione aberrante* tipica delle cellule staminali tumorali guida la formazione di una massa tumorale eterogenea.
- La *preservazione* delle cellule staminali tumorali è garantita dall'attivazione delle vie antiapoptotiche, dall'incremento dell'attività di trasportatori di membrana e da una spiccata attività di riparo di DNA.
- In seguito a xenotrapianto, le cellule staminali tumorali sono in grado di indurre la *formazione di un tumore fenotipicamente identico a quello originale*.

Tali caratteristiche riducono l'efficacia delle terapie convenzionali principalmente dirette contro le cellule tumorali differenziate o che si stanno differenziando .

1.2.2 Identificazione delle CSC

Sono stati proposti due macro-approcci per identificare e caratterizzare le CSCs all'interno del tumore. Il primo utilizza marcatori di superficie selettivamente espressi dalle CSCs, ma non dalla maggior parte delle cellule tumorali, mentre il secondo sfrutta alcune caratteristiche funzionali della cellula staminale tumorale, come la peculiare sensibilità/resistenza alla colorazione con specifiche sostanze.

Quindi i metodi per identificare le CSCs nei tumori solidi si basano su strategie mirate a riconoscere le cellule “staminali” dalla loro progenie differenziata. Questi includono l’efflusso di coloranti vitali mediante trasportatori multifarmaco, l’attività enzimatica dell’aldeide deidrogenasi, identificazione del fenotipo *side population*, saggi utilizzando opportune condizioni di coltura per la formazione di sfere e colonie e l’espressione di specifici antigeni di superficie . Una volta che la sottopopolazione delle cellule tumorali è stata isolata, si procede alla sua caratterizzazione mediante xenotrapianto che rimane il gold-standard per l’identificazione delle CSCs, usato per definire sia la tumorigenicità sia il potenziale di self-renewal di questa putativa popolazione di CSCs in vivo.

1.2.2.1 Antigeni di superficie

Nei diversi modelli di tumore umano, la popolazione cellulare è molto eterogenea e mediante opportuna valutazione fenotipica si possono distinguere cellule con caratteristiche di staminalità. Usando la citofluorimetria, è possibile valutare la diversa espressione fenotipica di questi markers ed eventualmente isolare il subset di cellule definiti come cellule inizianti il tumore (TICs). Molti di questi antigeni sono stati usati per la loro nota espressione nelle cellule staminali endogene.

Tra i più comuni antigeni individuati in HNSCC vi è il CD44, che è una grande glicoproteina di membrana, coinvolta nei processi di adesione e migrazione cellulare, che fa da recettore agli elementi della matrice extracellulare . In particolare è stato dimostrato che un subset di 5,000 cellule CD44⁺ in HSNCC se inoculato in topi immunodepressi dà luogo a processi di tumorigenesi, cosa che non si verificava nell’inoculare un’alta concentrazione di cellule CD44⁻ . Inoltre, laddove si ripresentava il tumore, si assisteva a

processi di differenziazione multipotenti e capacità di self-renewal delle cellule, caratteristiche comuni solo a cellule staminali .

Recenti studi nell'isolamento delle CSCs in HSNCC, hanno fatto ricorso al CD133 che è una proteina di membrana, la cui funzione resta ancora da chiarire. In linee cellulari di HNSCC, cellule CD133⁺, contrariamente a quanto accade per la controparte CD133⁻, mostrano un'aumentata clonogenicità, capacità di formare sfere tumorali e una forte tumorigenicità in modelli di xenotrapianti .

1. 2.2.2 Side Population

Questo metodo consiste nella detezione dei fenotipi della side-population (SP) mediante esclusione di Hoechst33342 . Le cellule sono marcate con un colorante (Hoechst 33342), in grado di legarsi al DNA delle cellule normali e renderle fluorescenti. L'Hoechst è un bis-benzimide molto lipofilo e quindi in grado di attraversare la membrana cellulare intatta. In seguito al suo legame al DNA emette sia nel blu a 424/44 nm sia nel rosso a 622/30 nm, una volta eccitato dalle radiazioni ultraviolette (UV 350 nm), ma questo non avviene nelle cellule con caratteristiche di staminalità per l'attivazione dei geni multidrug resistance (MDR). Il fenotipo MDR è associato ad un aumentato efflusso di farmaci dalle cellule mediato da pompe ATP-dipendenti con ampia specificità e con un alterato metabolismo e compartimentalizzazione dei farmaci. Il risultato è comunque una diminuzione del livello intracellulare dei farmaci nei siti bersaglio della loro azione. La presenza di queste pompe determina l'estruzione, oltre che di farmaci genotossici, anche di coloranti come l'Hoechst 33342. Il saggio prevede che un'aliquota della popolazione cellulare che contiene le cellule staminali venga preincubata con Verapamil, un farmaco in grado di bloccare le pompe molecolari che escludono l'Hoechst, perciò confrontando

la distribuzione nei canali di emissione dell'Hoechst delle cellule trattate rispetto a quelle non trattate è possibile identificare la regione delle cellule che costituiscono la side population . Le cellule SP rappresentano una piccola frazione di tutta la popolazione cellulare costituente la massa neoplastica ma, data la loro capacità di estrudere farmaci, esse rappresentano la frazione chemio-resistente all'interno del tumore .

Cellule SP da OSCC hanno riportato una forte tumorigenicità e clonogenicità nei saggi di xenotrapianti .

Nel caso di HNSCC, le SP hanno inoltre riportato un'overespressione di geni correlati alle cellule staminali, come Oct4, BMI-1, CD44 e una minore espressione di involucrine e CK13, geni associati al differenziamento.

1.2.2.3 Attività dell'aldeide deidrogenasi

L'aldeide deidrogenasi (ALDH) è un enzima citosolico, presente nel fegato, svolge diverse funzione tra cui la conversione del retinolo in acido retinoico e l'ossidazione dei metaboliti aldeide tossici, come quelli che si formano durante il metabolismo dell'alcool e con alcuni chemioterapici (ciclofosfamide e cisplatino..) . Alti livelli dell'attività ALDH sono stati rilevati nelle CSCs di colon, polmone e mammella , mentre ALDH1A1 è ritenuto un potenziale marker per CSCs nei tumori HSNCC . In conclusione tutti questi saggi sono basati essenzialmente su due considerazioni: le CSCs proliferano più lentamente delle

cellule che costituiscono la massa tumorale e trattengono o escludono il colorante in maniera differenziale rispetto alle cellule che formano la massa.

Clay et al. hanno dimostrato che solo 500 cellule ALDH⁺ danno luogo a un nuovo tumore HSNCC in seguito a xenotrapianto in topi immunodepressi, dieci volte meno rispetto alle cellule sortate solo CD44⁺.

1.2.2.4 Formazione di sfere

Questa metodica di isolamento replica la tecnica messa a punto, nel 1992, da Reynolds, che isolò cellule staminali neuronali attraverso una coltura in sosospensione. Questi notò che seminando le cellule a densità specifiche, queste ultime formavano spontaneamente dei *cluster sferici*, detti *neurosferi*. Queste ultime, caratterizzate da un compartimento staminale, se dissociate in singole cellule mostravano capacità di selfrenewal, formando nuove neurosfere. Analogamente, in condizioni di crescita serum-free su piastre ultra-low attachment, in diverse tipologie tumorali le CSCs si conservano in uno stato indifferenziato e proliferano guidate da opportuni fattori di crescita (EGF, FGF-β) formando aggregati clonali di cellule dette sfere, in cui si mima il microambiente della nicchia, garantendo così alle cellule possibilità di selfrenewal senza differenziamento. Infatti le CSCs sono in grado di formare colonie da una singola cellula e crescono come sfere in coltura.

Nei casi di HNSCC, le sfere sono state arricchite con markers di staminalità, tra cui CD44⁺, CD133⁺, Oct-4, mostrando elevata tumorigenicità in xenograft.

1.2.3 Prospettive nella terapia del cancro

Ad oggi le terapie esistenti sono più efficaci in quanto hanno mostrato un incremento del tasso di sopravvivenza dopo la diagnosi ma sono ancora fallaci circa una completa guarigione. Infatti, le CSCs sembrano essere resistenti ai chemioterapici, possono restare quiescenti per lunghi periodi di tempo e mostrano adattabilità in ambienti ipossici. Questo evidenzia ancora una volta la loro affinità con le cellule staminali normali, che rimangono protette in caso di danno cellulare o citotossicità. Inoltre molti agenti chemioterapici agiscono in funzione di un alto tasso di divisione cellulare come trattamenti antiproliferativi, non avendo alcun effetto sulle CSCs, le quali restano quiescenti e per lo più indivise.

I trattamenti chemioterapici, infatti, sono caratterizzati da scarsa selettività per quanto concerne le cellule bersaglio verso cui sono diretti. Per tale ragione il farmaco antineoplastico, oltre a danneggiare le cellule costituenti il tumore, spesso colpisce anche le cellule normali. La possibilità di mettere a punto specifici trattamenti diretti selettivamente contro le CSCs è sottesa all'acquisizione di informazioni riguardanti il loro comportamento biologico e la scoperta di metodi che riescono ad identificarle in una popolazione eterogenea di cellule tumorali .

Numerosi studi inerenti la resistenza delle CSCs a trattamenti sia di radio che di chemioterapia, responsabile delle recidive dei tumori, dimostrano che i trattamenti convenzionali sono ancora inefficaci. Inoltre le cellule staminali sono regolate da meccanismi serrati che prevengono e riparano eventuali danni del DNA, nel caso delle CSCs sembra che questi meccanismi siano ulteriormente potenziati e determinino la resistenza a chemioterapici e radioterapici .

Un target terapeutico molto interessante sarebbe poi quello di colpire selettivamente la nicchia delle CSCs, inducendo le cellule costituenti ad andare incontro a differenziamento o apoptosi .

Inoltre è stato dimostrato che molti pathways, come Wnt/ β -catenina, hedgehog, PTEN e Notch, hanno un ruolo fondamentale per la sopravvivenza non solo delle cellule staminali ma anche delle staminali tumorali; quindi, sviluppare terapie specifiche in funzione di questi potrebbero costituire in futuro una nuova possibilità di trattamento delle neoplasie .

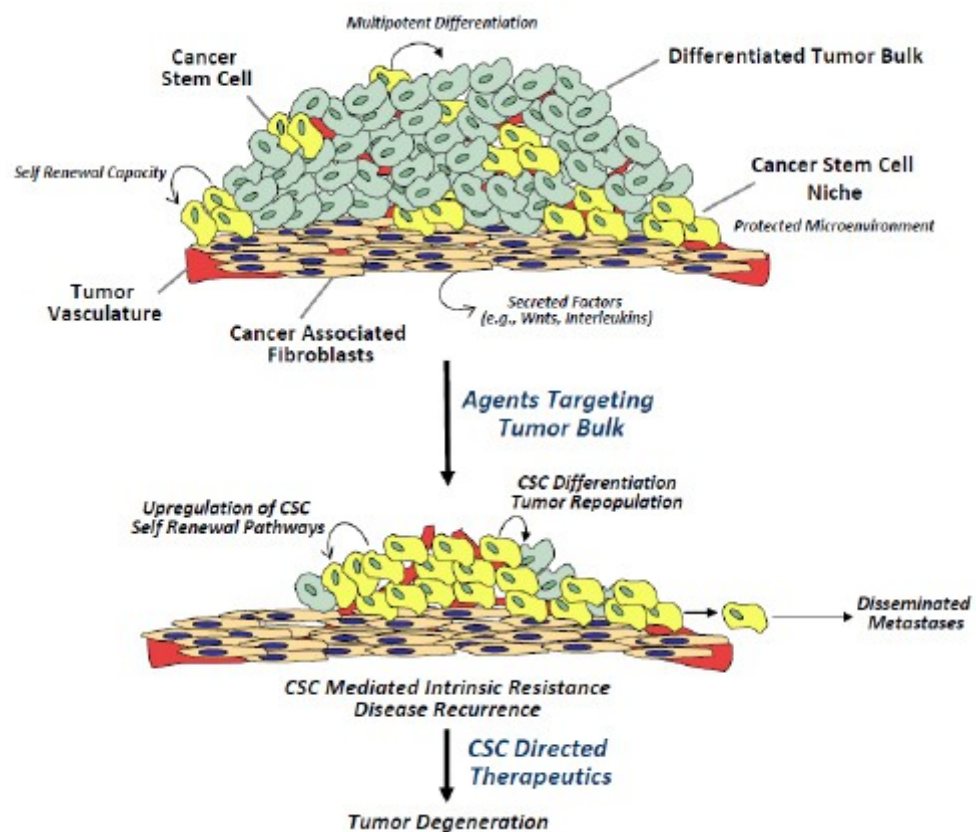


Figura2: Insorgenza e progressione del tumore

Nella maggior parte dei casi, le strategie terapeutiche correnti sono state sviluppate rispetto alla massa tumorale e non eradicano completamente le CSCs; per questo motivo, sarebbe ottimale sviluppare una terapia che vada a colpire in maniera specifica le CSCs rispetto alla massa tumorale, riconoscendo antigeni CSCs-Specifici. L'obiettivo è, quindi, quello di comprendere a pieno la biologia delle CSCs e sviluppare metodologie diagnostiche e terapeutiche che siano in grado di individuare, classificare e, quindi, trattare selettivamente le CSC.

1.3 CARCINOMA DELLA LARINGE

1.3.1 Epidemiologia e fattori di rischio

Nell'ambito dei carcinomi della regione testa-collo (HNSCC), il carcinoma della laringe rappresenta il 4,5% di tutti i tumori maligni e il 28% dei carcinomi delle prime vie aereo-digestive. Ha un'incidenza maggiore nei Paesi Europei rispetto agli Stati Uniti. In Italia la sua incidenza annua è pari a 15,5 casi ogni 100.000 abitanti. Tale neoplasia insorge prevalentemente in soggetti di sesso maschile rispetto a quello femminile (in Italia il rapporto M:F è di 10:1) e di età compresa tra 50 e 60 anni .

È noto che il fumo di sigaretta e il consumo di alcool sono i due maggiori fattori di rischio coinvolti nell'eziopatogenesi della patologia neoplastica della laringe, e specialmente quando presenti in combinazione hanno un effetto sinergico. Il fumo da sigaretta sembra essere il principale fattore di rischio relativo all'insorgenza di tale neoplasia. Infatti, in tal caso il rischio è proporzionale al livello di esposizione; è stato dimostrato che, fino al

livello del carcinoma franco, le alterazioni spesso regrediscono dopo la sospensione del fumo . Altri fattori che possono contribuire all'insorgenza del tumore includono fattori nutrizionali, l'esposizione a inquinanti ambientali e materiali tossici (amianto, nichel, cromo) e l'infezione da HPV .

Possono inoltre essere considerati fattori predisponenti alcune patologie infiammatorie croniche e precancerose (leucoplachia delle corde vocali, papillomatosi, ecc...). L'età più colpita è collocata nella quinta e sesta decade di vita .

1.3.2 Morfologia e sede di insorgenza

Il 95% dei casi di carcinoma laringeo è costituito da tumori a cellule squamose . Inoltre i tumori confinati all'interno della laringe propriamente detta sono detti **intrinseci** mentre quelli che si sviluppano all'esterno sono detti **estrinseci**. I carcinomi a cellule squamose della laringe seguono il pattern di accrescimento di tutti i carcinomi, iniziano con lesioni in situ che poi ulcerano fino ad assumere un aspetto fungoso .

Il carcinoma della laringe può svilupparsi in tre regioni distinte: sopraglottica, glottica e sottoglottica.

I tumori della regione sopraglottica presentano le seguenti caratteristiche:

- si mantengono a lungo all'interno di tale regione prima di estendersi alla regione glottica,
- hanno la tendenza ad invadere le strutture marginali sia in senso laterale sia verso l'alto,
- danno facilmente origine a metastasi ai linfonodi cervicali.

D'altro canto i tumori della regione glottica rappresentano le forme più comuni e possono svilupparsi sia verso la regione sovraglottica sia verso la regione sottoglottica. Colpiscono in genere una sola corda vocale, ma possono colpire entrambe le corde con diffusione attraverso la commessura anteriore, oltre che presentarsi come lesioni sincrone sulle due corde senza contiguità. In ragione della scarsa rete linfatica, le metastasi linfonodali sono meno frequenti e spesso monolaterali .

Risultano più rari (e di prognosi più infausta) i tumori della regione sottoglottica che possono colpire la faccia inferiore delle corde vocali fino ai primi anelli tracheali. A differenza degli altri due tipi tumori, questi riportano una evoluzione principalmente verso la trachea e facilmente metastatizzano ai polmoni .

1.3.3 Sintomatologia

Il quadro sintomatologico delle neoplasie laringee è correlato alla loro localizzazione, alle loro caratteristiche morfologiche e alla loro estensione.

Per quanto concerne le forme cordali, ventricolari e sottoglottiche una delle sintomatologie più frequenti è la disfonia. In particolare, nelle forme sovraglottiche non ventricolari si verifica spesso odinofagia; la dispnea e l'eventuale emoftoe, invece, sono segni rari e caratteristici solo di lesioni molto più avanzate.

Un grosso problema risulta essere l'associazione sintomi-diagnosi precoce, in quanto nella maggior parte dei casi la sintomatologia è indice di stadi avanzati della neoplasia. È evidente, invece, l'importanza di identificare questo tipo di tumori al fine di poter realizzare interventi limitati, che, pur attuando una exeresi radicale del processo

neoplastico, risparmiando la normale capacità fonatoria ed evitando provvedimenti chirurgici altamente mutilanti, quali la laringectomia totale .

Tuttavia i tumori glottici vengono diagnosticati facilmente nelle fasi iniziali, poiché è evidente sin da subito la presenza di disfonia e questo permette di intervenire parzialmente (cordotomie) con una prognosi eccellente (90-95% di sopravvivenza a cinque anni).

I carcinomi sopraglottici di solito provocano inizialmente una disfagia, spesso dolorosa, talora accompagnata da otalgia omolaterale. Anche nei linfomi sovraglottici, che inizialmente provocano disfagia e otalgia omolaterale, se diagnosticati precocemente, sono possibili interventi parziali (laringectomie sopraglottiche), con prognosi soddisfacente. Tuttavia quest'ultima è condizionata dall'estensione del tumore e dalle sue caratteristiche istologiche.

I tumori della regione sottoglottica hanno una sintomatologia iniziale spesso poco evidente. In questo caso il sintomo più precoce è costituito dalla disfonia, di solito non accentuata, che si aggrava quando la neoplasia invade il piano glottico. In tali forme neoplastiche, la diagnosi precoce è difficile; per tali ragioni è spesso necessario attuare un trattamento chirurgico demolitivo.

Invece le lesioni neoplastiche laringee, qualunque sia la sede di origine del tumore, se interessano segmenti estesi dell'organo, danno luogo ad un quadro sintomatologico progressivamente più complesso. I vari sintomi connessi alle funzioni fondamentali svolte dalla laringe vengono così ad associarsi. Alla disfonia, dovuta all'interessamento delle corde vocali, si accompagnano la dispnea, per la riduzione del lume laringeo, ed anche la disfagia, qualora siano coinvolti l'aditus laringeo ovvero la regione ipofaringea .

1.3.4 Stadiazione

Per quanto concerne il tumore primitivo, la classificazione clinica suddivide i carcinomi della laringe in localizzazioni sovraglottiche, glottiche e sottoglottiche (Tabella 2). In merito ai linfonodi, vale la stessa classificazione impiegata per le neoplasie della regione testa-collo, ad eccezione del tumore rinofaringeo (Tabella 3). Il metodo di classificazione TNM del tumore della laringe contempla 4 stadi patologici (Tabella 4) .

Tx	Tumore primitivo non definibile
T0	Tumore primitivo non evidenziabile
Tis	Carcinoma in situ
<i>Sovraglottide</i>	
T1	Tumore limitato ad una sola sottosedede della sovraglottide, con motilità normale delle corde vocali.
T2	Il tumore invade la mucosa di più di una delle sottosededi adiacenti della sovraglottide o della glottide o regioni esterne alla sovraglottide (ad esempio mucosa della base della lingua, vallecola, parete mediale del seno piriforme) senza fissazione della laringe
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione della corda vocale e/o invasione di una qualsiasi delle seguenti strutture: area post-cricoidea, tessuti pre-epiglottici, spazio paraglottico, e/o minima erosione cartilaginea
T4a	Il tumore invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (es. trachea, tessuti molli del collo, inclusi i muscoli estrinseci della lingua, muscoli pretiroidei, tiroide o esofago).
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche
<i>Glottide</i>	
T1	Tumore limitato alla(e) corda(e) vocale(i) (può coinvolgere la commissura anteriore o quella posteriore) con normale motilità
T1a	Lesione di una sola corda vocale
T1b	Lesione di entrambe le corde vocali
T2	Il tumore si estende alla sovraglottide e/o alla sottoglottide, e/o con compromissione della mobilità delle corde vocali
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione delle corde vocali e/o invade lo spazio paraglottico e/o presenta minima erosione cartilaginea
T4a	Il tumore invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (es. trachea, tessuti molli del collo, inclusi i muscoli estrinseci della lingua, muscoli pre-tiroidei, tiroide, esofago)
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche
<i>Sottoglottide</i>	
T1	Tumore limitato alla sottoglottide.
T2	Il tumore si estende a una o entrambe le corde vocali, con mobilità normale o compromessa
T3	Tumore limitato alla laringe con fissazione delle corde vocali
T4a	Il tumore invade la cartilagine tiroidea e/o si estende nei tessuti extra-laringei (es. trachea, tessuti molli del collo, inclusi i muscoli estrinseci della lingua, muscoli pretiroidei, tiroide o esofago).
T4b	Il tumore invade lo spazio prevertebrale, ingloba la carotide o invade le strutture mediastiniche

Tabella 2. Classificazione TNM del tumore della laringe: tumore primitivo.

Nx	Linfonodi regionali non valutabili
N0	Linfonodi regionali liberi da metastasi
N1	Metastasi in 1 solo linfonodo omolaterale di dimensione massima uguale o inferiore a 3 cm.
N2	Metastasi in un solo linfonodo omolaterale di dimensione massima fra 3 e 6 cm; in più linfonodi omolaterali, nessuno dei quali abbia dimensione massima superiore a 6 cm; o in linfonodi bilaterali o controlaterali nessuno con dimensione massima superiore a 6 cm
N2a	Metastasi in un solo linfonodo omolaterale di dimensione massima fra 3 e 6 cm
N2b	Metastasi in linfonodi omolaterali, nessuno dei quali abbia dimensione massima superiore a 6 cm
N2c	Metastasi in linfonodi bilaterali o controlaterali, nessuno dei quali abbia dimensione massima superiore a 6 cm
N3	Metastasi in qualsiasi linfonodo di dimensione massima superiore a 6 cm

Tabella 3. Classificazione TNM del tumore della laringe: linfonodi regionali.

<i>Stadio 0</i>	T1s	N0	M0
<i>Stadio I</i>	T1	N0	M0
<i>Stadio II</i>	T2	N0	M0
<i>Stadio III</i>	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
<i>Stadio IVA</i>	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
<i>Stadio IV B</i>	Ogni T	N3	M0
	T4b	Ogni N	M0
<i>Stadio IV C</i>	Ogni T	Ogni N	M1

Tabella 4. Stadiazione del tumore della laringe secondo il sistema TNM.

1.3.5 Diagnosi

L'esame laringoscopico indiretto costituisce il più comune metodo di esame della laringe e consente di porre con precisione diagnosi cliniche in oltre l'80% dei casi. Qualora sia impossibile eseguire un esame laringoscopico indiretto, a causa di una spiccata riflettività laringea ovvero per l'esistenza di condizioni anatomiche locali particolari (ad esempio un'epiglottide eccessivamente spostata dorsalmente), è consigliabile ricorrere all'endoscopia con fibroscopi flessibili introdotti attraverso il naso previa anestesia locale di superficie, oppure alla laringoscopia diretta in sospensione in anestesia generale.

Per quanto concerne la diagnostica per immagini, occorre distinguere i tumori limitati (T1) della regione glottica, in cui la diagnostica strumentale laringoscopica non necessita di supporto diagnostico con immagini, da tutti gli altri casi, per i quali è indicata una diagnostica per immagini volta a documentare l'estensione di malattia (T e N). A tale proposito dovranno essere effettuate una RM in prima istanza o una TAC in seconda istanza, in ambedue i casi con il relativo mezzo di contrasto. Nei casi in cui sia da rilevare solo l'impegno linfonodale nel collo una ecografia può trovare la giusta indicazione .

1.3.6 Approccio terapeutico

Il carcinoma della laringe, per il suo particolare comportamento biologico e per le caratteristiche strutturali dell'organo interessato, è un tumore che offre notevoli possibilità di trattamento radicale, con prognosi soddisfacente, mediante interventi chirurgici parziali, se la diagnosi viene effettuata precocemente, ovvero con interventi demolitivi qualora si tratti di forme neoplastiche estese.

Qualora non sia indicato un intervento conservativo, si deve prendere in considerazione l'ipotesi di un trattamento chemio-radioterapico combinato con un eventuale recupero chirurgico in caso di fallimento. Con l'eccezione del cancro limitato cordale, la chirurgia e la radioterapia devono prevedere l'asportazione o l'irradiazione del tumore primitivo e delle aree linfonodali .

1.3.7 Prognosi

Complessivamente il risultato del trattamento dei carcinomi laringei è alquanto soddisfacente, sia con trattamenti conservativi sia con quelli demolitivi. Ovviamente i risultati peggiorano nelle neoplasie più avanzate (stadio III e IV). Globalmente, considerando tutti gli stadi, la sopravvivenza a cinque anni oscilla tra il 50 e il 75%.

Nei tumori glottici limitati con motilità conservata, la guaribilità è elevata, sia con chirurgia conservativa sia con radioterapia (circa il 90%). Nei tumori sopraglottici T1-T2 la chirurgia conservativa e la radioterapia conseguono una sopravvivenza a cinque anni intorno al 70%. Nei tumori glottici T3 la laringectomia totale ottiene risultati ottimali (circa il 90%).

I più importanti fattori prognostici risultano essere: l'estensione del tumore, la sua sede, il grado di infiltrazione e la presenza di metastasi linfonodali .

1.4 SCOPO DEL LAVORO

Il carcinoma si sviluppa a partire da una cellula normale che subisce delle mutazioni tali da renderla neoplastica. Infatti la conversione di una cellula normale in una cellula tumorale richiede inevitabilmente la somma di più fattori, i quali raramente agiscono contemporaneamente. Spesso essi manifestano la loro azione durante un periodo di tempo piuttosto lungo (mesi o anni) determinando un accumulo di effetti che sfocia nello sviluppo e nella progressione della neoplasia. Durante tale processo di evoluzione, definito tumorigenesi, il tumore avanza progressivamente dagli stadi iniziali benigni e ben differenziati alle forme maligne dotate di capacità invasiva e metastatizzante.

Il concetto di crescita incontrollata non significa tuttavia che le cellule tumorali si dividano sempre in modo più rapido delle loro controparti normali. Il punto cruciale non è infatti rappresentato dalla velocità con cui le cellule si dividono, quanto piuttosto dalla relazione esistente tra i tassi di divisione, differenziamento ed eliminazione cellulare. Nei tessuti adulti normali, le percentuali di cellule che si dividono, che si differenziano e che vengono eliminate vengono mantenute in un preciso equilibrio (stato stazionario). Nei tumori, invece, il tasso di divisione supera quello di eliminazione, determinando perciò un aumento del numero di cellule in divisione con conseguente aumento della massa neoplastica.

Benché le cellule tumorali spesso esibiscano un largo numero di mutazioni, solo una piccola sottopopolazione risulta cruciale per lo sviluppo e il mantenimento del tumore. Studi condotti a tale riguardo hanno evidenziato che il tumore origina e viene mantenuto da cellule che posseggono caratteristiche di staminalità. Tali cellule cancerose definite “cellule staminali tumorali” (o cancer stem cells o

CSCs) guidano la progressione neoplastica e sono la possibile causa dell'eterogeneità del tumore.

Le CSCs rappresentano un modello utile per studiare i meccanismi alla base dell'oncogenesi. In quest'ottica è risultato interessante affrontare uno studio volto all'identificazione e alla caratterizzazione molecolare e fenotipica delle cellule staminali cancerose nel tumore della laringe. Tale ricerca è stata condotta a carico delle Hep-2, una linea cellulare continua e ben differenziata di carcinoma laringeo umano. Mediante uno specifico protocollo di crescita, la coltura cellulare di Hep-2 è stata arricchita in cancer stem cells. Successivamente, il potenziale tumorigenico delle Hep-2 arricchite in CSCs è stato valutato mediante analisi *in vivo*.

2 MATERIALI E METODI

2.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE CELLULARI

Nel presente studio sono state analizzate linee cellulari commerciali di carcinoma squamocellulare della regione testa-collo (HNSCC). La caratterizzazione fenotipica delle linee cellulari è stata effettuata determinando la velocità di replicazione mediante conta cellulare e la capacità tumorigenica *in vivo*. La presenza delle CSCs a carico delle linee analizzate è stata verificata valutando il livello di espressione dei marcatori di staminalità CD133 e CD44 mediante analisi immunocitochimica.

2.1.1 Colture cellulari

Le linee cellulari immortalizzate di HNSCC (PE15, PE34, PE46, PE49, HSC-2, HSC-3, Ca9-22, KB, Hep-2) sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Le cellule PE15, PE34, PE46, PE49, Ca9-22, KB, Hep-2 sono state fatte crescere in aderenza con l'aggiunta di terreno DMEM/F-12, mentre nel caso delle linee cellulari HSC-2, HSC-3 è stato utilizzato come terreno l'RPMI. In ogni caso, ai terreni sono stati addizionati penicillina 100 U/ml, streptomina 100 µg/ml e FBS (siero bovino fetale) 10%, e mantenute in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

2.1.2 Test di vitalità cellulare

Per valutare la vitalità cellulare è stato impiegato un test colorimetrico in grado di stimare la quantità di cellule vitali in una popolazione cellulare. Il test si basa sull'impiego del Trypan Blue (Sigma-Aldrich), un colorante che viene escluso dalle cellule aventi membrana intatta, ma che penetra solo nelle cellule danneggiate colorandole in maniera intensa.

La vitalità cellulare è stata calcolata sottraendo al numero totale di cellule contate quelle colorate di blu e quindi morte.

Le cellule messe in coltura, dopo aver raggiunto una confluenza dell'80%, dopo due lavaggi con soluzione salina sterile di PBS (Phosphate Buffered Saline), sono state staccate con tripsina 0,5% ed EDTA 0,2% in PBS. Dopo 10 minuti in incubatore a 37°C, la tripsina è stata inattivata con l'aggiunta di 10 ml di terreno completo al 10% FBS. Dopo accurata risospensione delle cellule contenute nella fiasca, la sospensione cellulare è stata trasferita in una provetta da 15 ml e centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. A questo punto in una Eppendorf sono stati preparati 100 µl di Trypan Blue Solution 0,4% diluito 1:1 in D-PBS, ai quali sono stati aggiunti 100 µl della sospensione cellulare appena preparata. Dopo aver mescolato delicatamente e atteso 2-5 minuti per permettere al colorante di penetrare nelle cellule morte, è stata eseguita la conta mediante un emocitometro (camera di Burker) ed un microscopio ottico. Sono stati prelevati 100 µl di sospensione cellulare e trasferiti nella camera dell'emocitometro fino a riempirla completamente per capillarità. Sono state contate le cellule contenute in nove riquadri con triplo confine posti nella camera di Burker.

Poichè ogni riquadro dell'emocitometro rappresenta un volume totale di 10^{-4} cm³ e

poichè 1 cm³ corrisponde approssimativamente ad 1 ml, la concentrazione cellulare/ml è stata di conseguenza calcolata mediante la formula di seguito riportata:

$$\text{Cellule totali contenute nella fiasca} = (N/9) \times 2 \times 10 \times 10.000$$

dove:

- N è il numero di cellule che sono state contate all'interno dei nove quadrati con triplo confine,
- 9 sono i quadrati con triplo confine che costituiscono la camera di Burker,
- 2 è il fattore di diluizione (100 µl di sospensione cellulare e 100 µl trypan blue),
- 10 è il volume totale di terreno con cui sono state risospese le cellule, e
- 10⁴ è il fattore di conversione.

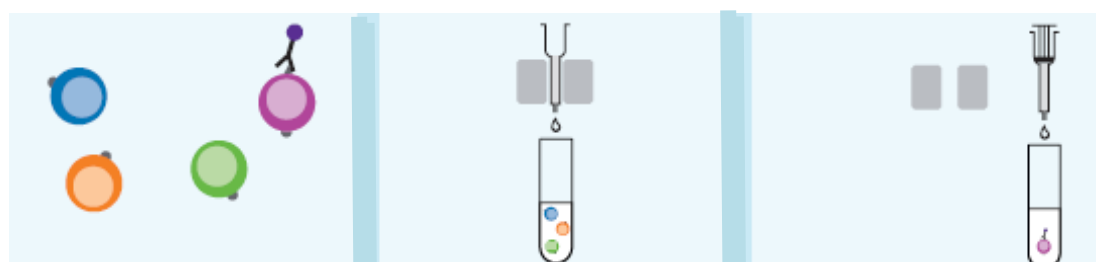
La conta è stata effettuata per tutte e 9 le linee cellulari (punto zero). Successivamente le cellule sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti (20.000 cellule a pozzetto). Per ogni linea cellulare la semina è stata eseguita in triplicato e la conta è stata ripetuta per ciascuna linea a 24, 48 e 72 ore dalla semina (punto zero).

2.1.3 Cell Sorting Magnetico e citometria a flusso

Le cellule KB marcate con CD133, sono state sottoposte a separazione immunomagnetica utilizzando un *cell sorting* ad attivazione magnetica (MACS) e isolate con il kit per CD133 (Miltenyi Biotec), secondo il protocollo fornito dalla Miltenyi. Brevemente, le cellule KB sono state lavate in PBS e risospese in 80 µl di un buffer così composto: PBS a pH 7.2, albumina di siero bovino allo 0.5% e acido tetracetico etilendiammide (EDTA) alla concentrazione di 2 mmol/L. A questo punto, al buffer con le cellule sono stati aggiunti 20µl di FcR Blocking Reagent

per inibire la formazione di legami aspecifici Fc-mediati dell'anticorpo con cellule diverse dal nostro target. 10 μ l di CD133/2 (293C3) antibody PE-conjugated mouse monoclonal IgG2b (Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany) sono stati aggiunti alle cellule. Il reagente è stato incubato al riparo dalla luce per 10 minuti a 4-8 °C. Le cellule sono state lavate con 1-2ml di buffer, quindi i pellets sono risospesi in 80 μ l di buffer e 20 μ l di anti-PE microbeads, ossia particelle superparamagnetiche coniugate con un anticorpo (Miltenyi Biotech) (Figura 3).

Figura 3



1) Marcatura magnetica

Le cellule target sono marcate magneticamente con MACS Microbeads (cellula viola)

2) Separazione magnetica

Le cellule vengono inserite in una colonna e quindi nel separatore. L'eluato viene raccolto come frazione negativa, priva di cellule marcate. La frazione positiva viene trattenuta in colonna per azione di un forte campo magnetico

3) Eluizione della frazione di cellule marcate

La colonna viene rimossa dal separatore. Le cellule trattenute vengono eluite come frazione arricchita mediante selezione positiva

I campioni sono stati incubati per 10 minuti a 4 °C. Poi le cellule sono state lavate con il buffer e centrifugate a 300g per 10 minuti. Il Supernatante è stato spipettato fuori mentre il pellet con le cellule è stato nuovamente sospeso in 500 μ l di buffer. La colonna MS (codice 130-042-201) è stata posta nel campo magnetico del separatore MACS (Miltenyi Biotech). La colonna è stata

lavata con 500 μ l di buffer. La sospensione di cellule con 0.5 ml di buffer è stata fatta passare nella colonna, lavata precedentemente ben 3 volte con 0.5 ml di buffer. La colonna poi è stata rimossa dal separatore e posta nel tubo collettore. 1ml di buffer è stato pipettato all'interno della colonna.

La frazione di cellule marcate magneticamente è stata espulsa usando lo stantuffo in dotazione con la colonna (CD133 positive). L'efflusso è stato raccolto come negativo, mentre le cellule marcate magneticamente sono la frazione positiva.

Per incrementarne la purezza, entrambi le frazioni di cellule sono state fatte passare nuovamente nelle rispettive colonne.

Una piccola parte di cellule tumorali sortate CD133 sono state usate per valutare l'efficienza della separazione magnetica mediante citometria a flusso.

2.1.4 Espressione di CD133 nella linea KB mediante analisi con citometria a flusso

L'espressione di CD133 è stata valutata prima e dopo la separazione con un anticorpo monoclonale di mouse PE-coniugato CD133/2 (Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany). Le cellule KB marcate anti-CD133/PE sono state risospese in 0.5 ml of PBS per l'analisi con citometria a flusso. I legami aspecifici sono stati individuate incubando la sospensione di cellule con un isotipo di controllo IgG2b/PE (Miltenyi Biotec). L'analisi con citometria di flusso delle cellule marcate è stata ottenuta con FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA), dotata di un laser ad argon 15 mW con emissione a 488

nm. Il segnale light scatter è stato valutato su scala lineare e il segnale a fluorescenza nel rosso è stato valutato in scala logaritmica. Il gate scatter è stato settato in modo da escludere cellule morte e aggregati. Un minimo di 10^4 cellule è stato contato per ciascun campione. Tutti i dati sono stati raccolti ed analizzati usando come software il CellQuest (BD Biosciences, San Jose, CA). I markers statistici sono stati ottenuti usando un controllo isotipo-matched come riferimento. Tipicamente, le cellule positive all'1% sono state usate come controllo.

2.1.5 Analisi di tumorigenicità *in vivo*

La capacità tumorigenica delle 9 linee cellulari è stata valutata *in vivo* inoculando le cellule in topi nudi immunodeficienti BALB/c nu/nu provenienti e stabulati in armadi termostatici presso l'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico di Ancona (I.N.R.C.A). I topi nudi BALB/c nu/nu si definiscono per due caratteristiche: aplasia del timo e assenza di pelo. L'assenza di timo nel topo nudo causa una deficienza del sistema immunitario che si compone quasi interamente di cellule B e di cellule Natural Killer, con riduzione quantitativa e funzionale della popolazione di cellule T. L'inabilità al rigetto di tessuto neoplastico allogeneico o xenogeneico rende il topo nudo un modello per lo studio *in vivo* di tumori umani. Per queste loro caratteristiche i topi sono più soggetti a infezioni e/o malattie trasmissibili tra specie diverse e non possono venire a contatto diretto con altri ceppi di topo, anche il contatto con l'uomo deve avvenire in maniera opportuna. Gli animali provenienti dall'I.N.R.C.A sono stati alimentati con dieta standard bilanciata che tiene conto dei loro fabbisogni nutrizionali; l'acqua di abbeveraggio è stata cambiata una volta alla settimana per evitare crescite batteriche e

micotiche. Gli animali, nel rispetto dei ritmi circadiani, sono stati mantenuti con luce naturale e con un'alternanza di cicli giorno/notte fisiologici dipendente dai fattori stagionali; inoltre le gabbie a contatto con gli animali sono state previamente sterilizzate tramite autoclave o raggi UV. Durante tutta la durata dell'esperimento i topi sono stati mantenuti in un ambiente controllato, isolato da eventuali contaminazioni batteriche e virali tramite un armadio ventilato munito di filtri HEPA ed al carbonio attivo e termostato ad una temperatura di 24-25°C. Per effettuare l'inoculo le cellule sono state staccate con tripsina 0,5% ed EDTA 0,2% e diluite in una soluzione contenente PBS e matrigel (BD Biosciences).

Topi nudi di 6 settimane sono stati divisi in 9 gruppi di 4 animali ciascuno e ad ogni gruppo, sono state inoculate sottocute, nella regione sacrale, 2×10^6 cellule di una specifica linea cellulare, risospese in 100µl di PBS + 100µl di matrigel.

La crescita del tumore è stata misurata con il calibro settimanalmente e il volume della massa tumorale è stato calcolato utilizzando la formula lunghezza x altezza x ampiezza. La misurazione è stata effettuata per un totale di 8 settimane.

2.1.6 Analisi immunocitochimica

L'analisi immunocitochimica è stata eseguita sulle nove linee cellulari per valutare il livello di espressione dei marcatori di staminalità CD133 e CD44. Le 9 linee cellulari sono state seminate in una 24 well (100.000 cellule a pozzetto), in cui era stato precedentemente inserito, in ogni pozzetto, un vetrino sterile da 13 mm (Zeus, Vetrotecnica, Padova, Italy). Dopo 24 ore le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% in PBS per 10 minuti, lavate 3 volte con PBS per 5 minuti

e successivamente permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,1% per 5 minuti. Dopo 2 lavaggi in PBS, si è proceduto al bloccaggio dei siti aspecifici utilizzando una soluzione costituita da BSA (bovine serum albumin) allo 0,1% in PBS (PBSA) e siero di cavallo al 10% (Vector Laboratories), per 1 ora a temperatura ambiente. Le linee cellulari sono state incubate con l'anticorpo primario anti-CD133 (Miltenyi Biotec) diluito 1:50 nella soluzione di PBSA, o con l'anticorpo primario anti-CD44 (Abcam) diluito 1:60 nella soluzione di PBSA e conservate a 4°C overnight.

Il giorno seguente i vetrini, dopo 2 lavaggi in PBS, sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti-mouse o anti-rabbit (Vector Laboratories) coniugato alla biotina e diluito 1:200 in PBSA. Successivamente i vetrini sono stati incubati con il complesso avidina-perossidasi (Vector Laboratories) in PBSA per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi in PBS da 5 minuti ciascuno, le cellule sono state incubate con perossido di idrogeno e 3,3'diaminobenzidina (Vector Laboratories) per 10 minuti e successivamente lavate con acqua. Al termine dell'incubazione si è proceduto alla colorazione dei nuclei con il colorante di contrasto Ematoxylin QS (Vector Laboratories) per 5 minuti.

Infine è stata effettuata una disidratazione alcolica eseguendo lavaggi da 5 minuti ciascuno con soluzioni di etanolo a concentrazioni crescenti. Per il montaggio dei vetrini è stato utilizzato il Glycergel (Dako) e i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico.

2.2 ANALISI DELLA LINEA CELLULARE HEP-2

Successivamente, la nostra attenzione si è focalizzata sulla linea cellulare di carcinoma della laringe Hep-2, in quanto è risultata essere una tra le linee più tumorigeniche. Su tale linea è stato effettuato un tentativo di arricchimento in termini di cellule staminali cancerose. Le CSCs sono state in seguito caratterizzate da un punto di vista molecolare ed è stato studiato il loro potenziale tumorigenico *in vivo*.

2.2.1 Arricchimento delle Hep-2 in CSCs

L'arricchimento della linea cellulare Hep-2 è stato ottenuto mediante crescita cellulare nel terreno di coltura deprivato di siero e addizionato di specifici fattori di crescita: human recombinant basic fibroblastic growth factor (bFGF) ed human recombinant epidermal growth factor (hrEGF) .

In particolare, la linea cellulare Hep-2 è stata staccata con tripsina 0,5% ed EDTA 0,2%, le cellule sono state contate, centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e 2×10^6 cellule sono state seminate in 2 fiasche T25.

Nella prima fiasca di controllo è stato aggiunto il terreno con addizionati 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina e 10% FBS; mentre nella seconda fiasca le cellule sono state fatte crescere in terreno DMEM/F-12 privo di siero a cui sono stati aggiunti 10 ng/ml bFGF e 20 ng/ml hrEGF.

Entrambe le fiasche sono state mantenute in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e periodicamente sono stati eseguiti opportuni cambi di terreno con aggiunta di bFGF e hrEGF nella seconda fiasca. Dopo circa 6 settimane dalla semina le cellule cresciute in assenza di siero e in presenza di

fattori di crescita hanno formato aggregati sferici che potevano essere attribuiti alla presenza di un elevato numero di cellule staminali cancerose.

2.2.2 Analisi immunocitochimica

Al fine di confermare l'avvenuto arricchimento in cellule staminali tumorali le cellule Hep-2 di controllo e le Hep-2 arricchite in CSCs sono state assoggettate ad analisi immunocitochimica per valutare il livello di espressione di specifici markers di staminalità. Le cellule sono state seminate in una 24 well (100.000 cellule a pozzetto), in cui era stato precedentemente inserito, in ogni pozzetto, un vetrino sterile da 13 mm (Zeus, Vetrotecnica, Padova, Italy) ed è stata eseguita l'immunocitochimica per i markers CD133 e CD44, secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.1.4.

2.2.3. Real time PCR

L'identificazione delle cancer stem cells è stata inoltre verificata mediante l'analisi di espressione genica di NNMT e di marcatori di staminalità quali CD133, CD44, Oct-4, Sox-2, Nanog, Nestin, ABCG2 e BMI-1. A tale scopo le cellule di controllo e le cellule arricchite in CSCs sono state staccate con tripsina, contate e centrifugate a 10000 rpm per 5 minuti a 4°C. I pellet cellulari (1×10^6 cellule) sono stati assoggettati all'estrazione dell'RNA mediante l'impiego del Kit SV Total RNA Isolation System (Promega).

L'RNA totale isolato è stato retrotrascritto utilizzando il kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e i nonameri quali primers. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato quale template per analisi Real-Time PCR al fine di determinare

quantitativamente l'espressione differenziale dei markers di staminalità nelle cellule arricchite rispetto alle cellule di controllo è stata effettuata mediante Real-Time PCR, metodica che consente la simultanea amplificazione e quantizzazione del template utilizzato quale stampo . Grazie all'emissione di fluorescenza da parte del prodotto di amplificazione è possibile monitorare in tempo reale lo stato di avanzamento della reazione. Tale risultato si ottiene in virtù dell'impiego di marcatori fluorescenti, il cui accumulo, a livello del prodotto di amplificazione, segue la stessa cinetica della reazione a catena della polimerasi. La fluorescenza emessa in seguito ad irraggiamento da parte di una sorgente luminosa a carico del termociclatore viene acquisita da un lettore ottico e il segnale ottenuto è rielaborato da un software opportuno. La chimica adottata per la rilevazione dei prodotti di amplificazione ha previsto l'impiego dell'EvaGreen, quale molecola fluorescente in grado di intercalarsi al doppio filamento di DNA.

In una reazione di amplificazione la quantità di prodotto che si forma dopo un ciclo termico raddoppia al ciclo successivo. Pertanto, misurando l'incremento di fluorescenza dovuto alla formazione di nuovo prodotto all'avanzare dei cicli, è possibile ricavare la curva di amplificazione del template di interesse, avente un andamento sigmoide. Nella fase esponenziale crescente di tale curva è possibile individuare un ciclo di amplificazione ottimale a cui corrisponde un valore di fluorescenza che è misura della quantità di prodotto che si è formato: il ciclo soglia (Ct). Graficamente il Ct è determinato dalla proiezione sull'asse delle ascisse del punto in cui la curva di amplificazione interseca la linea di base, al di sopra della quale qualsiasi incremento di fluorescenza diventa significativo. I prodotti di amplificazione sono stati quantizzati mediante il metodo di quantizzazione relativa, valutando le differenze nei livelli di espressione del gene

di interesse (GOI) e del gene housekeeping (HKG) ed il relativo controllo mediante il confronto dei cicli soglia (ct). Per poter effettuare tale confronto è necessario scegliere un gene di riferimento che funga da standard interno sia per il campione, sia per il controllo e che sia diverso dal gene d'interesse (GOI): il gene housekeeping (HKG). Calcolati i valori di Ct relativi al GOI e all'HKG si procede quindi alla determinazione del $\Delta Ct = (GOI\ Ct - HKG\ Ct)$. Il parametro che quantifica l'espressione relativa del GOI nel campione (S) rispetto al controllo (C) è pari a

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(S\Delta Ct - C\Delta Ct)}$$

L'analisi dell'espressione dei geni di staminalità nei campioni è stata condotta utilizzando il CFX96 Real-time PCR Detection System (BIO-RAD). Relativamente a ciascun campione sono state allestite miscele di reazione di 20 μ l (in duplicato) contenenti 1 μ l di cDNA da pellet cellulare, 10 μ l di EvaGreen Supermix (BIO-RAD) e i primers specifici per i geni d'interesse (GOI) e per la β -actina (HKG), ad una concentrazione finale pari a 500 nM. Le condizioni di reazione hanno previsto lo svolgimento di 40 cicli di amplificazione, ciascuno dei quali costituito da una fase di denaturazione a 95°C per 30" e da una fase di annealing-elongazione a 58°C per 30". Le sequenze nucleotidiche relative alle coppie di primers impiegati per l'amplificazione dei geni di staminalità sono:

CD133-f \rightarrow 5'-TGCTGCTTGTGGAATAGACAGAATG-3'

CD133-r \rightarrow 5'-AGGAAGGACTCGTTGCTGGTGAA-3'

CD44-f → 5'-CGGACACCATGGACAAGTTT-3'

CD44-r → 5'-GAAAGCCTTGCAGAGGTCAG-3'

Oct-4-f → 5'-CTTGCTCGAGAAGTGGGTGGAGGAA-3'

Oct-4-r → 5'-CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA-3'

Sox-2-f → 5'-ACTTTTGTTCGGAGACGGAGA-3'

Sox-2-r → 5'-CATGAGCGTCTTGGTTTTCC-3'

Nanog-f → 5'-GATTTGTGGGCCTGAAGAAA-3'

Nanog-r → 5'-AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG-3'

Nestin-f → 5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3'

Nestin-r → 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'

ABCG2-f → 5'-CACCTTATTGGCCTCAGGAA-3'

ABCG2-r → 5'-TGCCACAGCAGTGGAATCT-3'

BMI-1-f → 5'-ATGATAAAAGATACTTACGATGCCAG-3'

BMI-1-r → 5'-GAACTCTGTATTTCAATGGAAGTGGAC-3'

β-actina-f → 5'-TCCTTCCTGGGCATGGAGT-3'

β-actina-r → 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

NNMT primers: forward 5'-GAATCAGGCTTCACCTCCAA-3', reverse

5'-TCACACCGTCTAGGCAGAAT-3';

2.2.4 Analisi dell'attività enzimatica NNMT

Per analizzare l'attività dell'enzima Nicotinamide N-metiltransferasi (NNMT) della popolazione di cellule Hep-2 arricchite in CSCs si è fatto ricorso al saggio catalitico basato su HPLC.

Un pellet di cellule congelate (5×10^6 cells) è stato risospeso in $\frac{1}{2}$ vol di glass beads e 200 μ l di buffer di lisi, composto da tris-HCL 50 mM, pH 8.6, 2 μ g/ml di aprotinina, 1 mM PMSF (phenylmethyl sulfonyl fluoride), ditiotreitolo (DDT) e all'1% di Nonidet P40. La sospensione ottenuta è stata vortexata a velocità massima per 2 minuti e poi messa in ghiaccio per altri 2 minuti. L'omogenato cellulare è stato poi centrifugato a 1600x g per 10 minuti a 4°C. e quindi conservato a 4°C fino al momento del suo utilizzo per il saggio.

La composizione della soluzione standard per il saggio è costituita da 50 mM di tris-HCL a pH 8.6, DTT 1 mM, nicotinammide 5 mM e S-adenosil-L-metionina 0.5 mM a cui è aggiunta una quantità adeguata di campione dell'enzima al fine di ottenere un volume finale pari a 350 μ l. La reazione ha inizio in seguito all'aggiunta del substrato di S-adenosil-L-metionina e prevede un periodo di incubazione a 37°C per 30 e 60 minuti. Per bloccare la reazione sono stati aggiunti ai 100 μ l di miscela di reazione 50 μ l di HClO₄ 1.2 M tenuti in ghiaccio. Dopo 10 minuti a 0°C, i campioni vengono centrifugati in una microcentrifuga per 1 minuto e vengono aggiunti 130 μ l di acido perclorico; le proteine restano separate nel sovrantante neutralizzando l'acido con 35 μ l di K₂CO₃ 0.8 M. Il KClO₄ formato viene rimosso con centrifugazione e 100 μ l di sovrantante vengono processati nel sistema di HPLC 10 DVP-UV-Vis (Shimadzu, Duisburg,

Germania) usando un Supelcosil LC-18 5 μm di 250x4.6 mm di diametro interno. Le condizioni di eluizione sono descritte in letteratura . L'attività enzimatica è stata testata misurando la quantità di N-metilnicotinamide prodotta, ossia si è considerato che l'area sottesa da un picco del composto separato con 1U corrisponde alla formazione di 1nmol di N-metilnicotinamide per un'ora di incubazione a 37°C.

2.2.5 Test di tumorigenicità *in vivo*

Per valutare la capacità tumorigenica delle cellule di controllo e di quelle arricchite, le cellule sono state inoculate in topi nudi immunodeficienti BALB/c nu/nu provenienti e stabulati in armadi termostatici.

Dieci topi di 6 settimane sono stati divisi in 2 gruppi di 5 animali ciascuno. Nel primo gruppo sono state inoculate sottocute 250.000 cellule Hep-2 di controllo risospese in 100 μl di PBS + 100 μl di matrigel sul fianco destro e sinistro di ciascun animale; nel secondo gruppo sono state inoculate 250.000 cellule Hep-2 arricchite risospese in 100 μl di PBS + 100 μl di matrigel sul fianco destro e sinistro di ciascun animale.

La crescita del tumore è stata misurata con il calibro settimanalmente e il volume della massa tumorale è stato calcolato utilizzando la formula lunghezza x altezza x ampiezza. La misurazione è stata effettuata per un totale di otto settimane. I topi sono stati sacrificati e le masse sono state prelevate. Una parte dei campioni è stata inclusa in paraffina, mentre la restante parte è stata congelata in aliquote. I campioni congelati sono stati assoggettati ad analisi mediante Real-time PCR, mentre i paraffinati ad analisi istologica ed immunoistochimica.

2.2.6 Analisi istologica

L'analisi istologica è stata effettuata per confermare la diagnosi istopatologica. Per ogni campione sono state tagliate più sezioni istologiche utilizzate per la colorazione con ematossilina-eosina.

Dopo opportuni cicli di sparaffinatura il vetrino viene immerso per 5 minuti nel colorante ematossilina e successivamente lavato con acqua corrente per eliminare il colorante in eccesso e far virare il colore. Tutti i vetrini, poi, vengono colorati con eosina per circa 1-2 minuti. Terminata la colorazione, sono le sezioni state disidratate mediante trattamento con una serie di alcoli a concentrazione ascendente ed infine sono stati lavati in xilene. Tutti i vetrini sono stati montati manualmente.

2.2.7 Analisi Immunoistochimica

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita per valutare l'espressione dei markers di staminalità CD133 e CD44 nelle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 di controllo e da quelle derivanti dalle Hep-2 arricchite in CSCs. Le sezioni ottenute dalle masse sono state montate su vetrini ricoperti da poly-L-lisina; i preparati così ottenuti sono stati asciugati per una notte in stufa a 37°C. Il giorno seguente le sezioni sono state deparaffinate e reidratate con scala discendente degli alcoli; lo smascheramento dei siti antigenici è stato effettuato immergendo i vetrini in tampone citrato a pH 6 e trattando le sezioni con microne a 250W per 10 minuti. Dopo un lavaggio in tampone citrato; la perossidasi endogena è stata bloccata con H₂O₂ al 3% in acqua per 10 minuti. Successivamente i vetrini sono

stati lavati in acqua e incubati per 24 ore a 4°C in camera umida con i seguenti anticorpi: l'anticorpo primario anti-CD133 (Miltenyi Biotec) diluito 1:50 nella soluzione di PBSA, o con l'anticorpo primario anti-CD44 (Abcam) diluito 1:60 nella soluzione di PBSA. Dopo rimozione dell'anticorpo primario e una serie di lavaggi in PBS, i vetrini sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario biotin anti-mouse e biotin anti-rabbit (Vector Laboratories) diluiti 1:200 in PBSA. Successivamente i vetrini sono stati incubati con il complesso avidina-perossidasi (Vector Laboratories) in PBSA per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi in PBS da 5 minuti ciascuno, le cellule sono state incubate con il H₂O₂ e il substrato cromogeno 3,3'diaminobenzidina (Vector Laboratories) per 5 minuti e successivamente lavate con acqua. Infine si è proceduto alla colorazione dei nuclei con il colorante di contrasto Ematoxylin QS (Vector Laboratories) per 5 minuti. Per il montaggio dei vetrini è stato utilizzato il Glycergel (Dako) e le sezioni sono state osservate al microscopio ottico .

2.2.8 Real-time PCR

Le masse congelate sono state analizzate mediante Real-Time PCR per valutare l'espressione dei geni di staminalità. L'RNA totale è stato isolato da aliquote di tessuto (20-40 mg) mediante l'impiego del Kit SV Total RNA Isolation System (Promega).

L'RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando il kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e i nonameri quali primers e il cDNA ottenuto è stato utilizzato quale template per l'amplificazione mediante Real-Time PCR .

La determinazione quantitativa dell'espressione differenziale dei markers di staminalità nelle masse derivanti dall'inoculo delle cellule arricchite rispetto alle

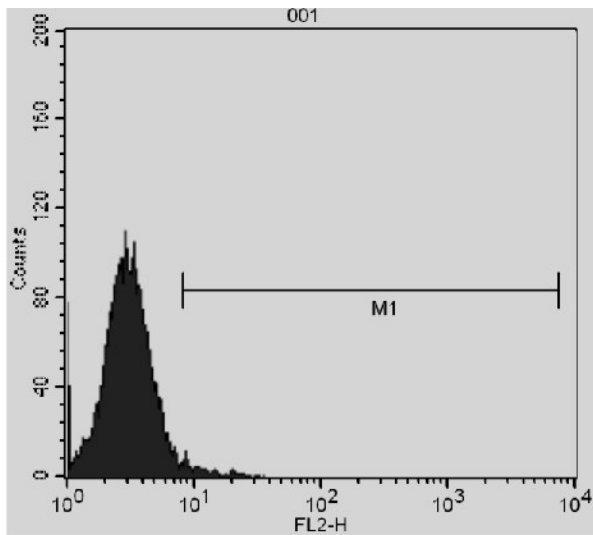
masse derivanti dalle cellule di controllo è stata effettuata secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.2.3.

3 RISULTATI

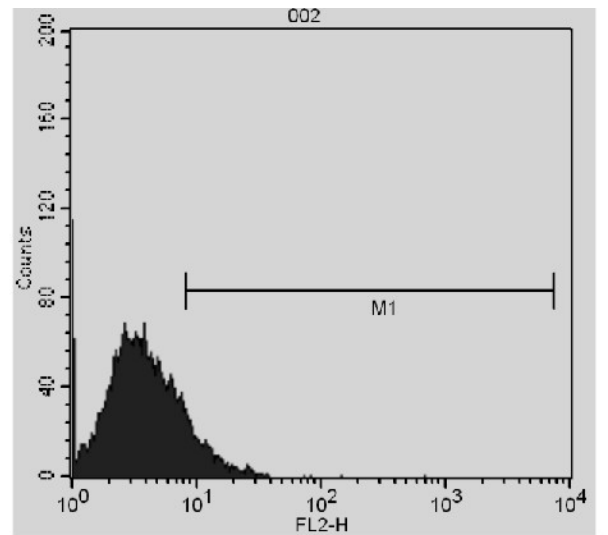
3.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE CELLULARI

3.1.1 Espressione di CD133 nella linea KB e separazione magnetica

La presenza di cellule KB CD133⁺ è stata analizzata quantitativamente mediante citometria a flusso. Come si vede nel pannello A (figura 4), il 1.13% +/- 0.83% (n 5, 30) di cellule KB non sortate esprime l'antigene di membrana AC133. Ciò suggerisce che le cellule staminali CD133⁺ glicosilate sono una piccola frazione della linea cellulare KB (<1% della popolazione totale). Le cellule CD133(+) sono state isolate dalla linea cellulare KB usando la separazione magnetica MiniMACS. Per valutare l'efficienza della separazione magnetica, le cellule raccolte sono state analizzate con citometria a flusso. Dopo l'isolamento, la frazione di cellule CD133(+) era del 10.26% +/- 1.9%. (Figure 1). Un secondo step di purificazione non è servito a migliorare l'arricchimento. Di contro la frazione CD133(-) ha evidenziato una totale negatività nell'espressione del CD133. Le CD133(+) e CD133(-) non sortate non hanno riportato nessuna differenza morfologica. Tutte le cellule avevano una forma fusiforme ed erano molto grandi. Ad una visione ad alta potenza si può rilevare una divisione meiotica patologica.



A



B

Figura 4: Analisi FACS e tumorigenicità delle KB; l'analisi FACS delle KB arricchite in CD133 mediante miniMacs, prima (A) e dopo la colonna (B).

3.1.2 Test di vitalità cellulare

Il test di vitalità è stato eseguito per tutte e nove le linee cellulari, contando le cellule a 24, 48 e 72 ore dalla semina (punto zero). Le linee cellulari Hep-2, KB e PE46 sono risultate essere tra le più vitali (Figura 5).

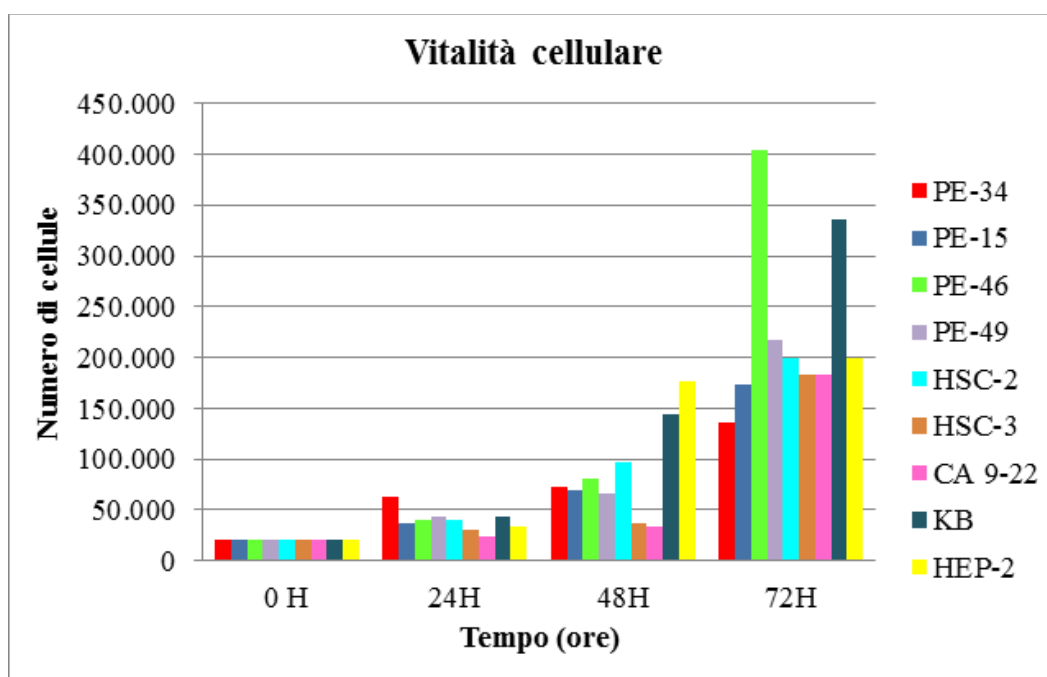


Figura 5. Il diagramma a barre mostra il numero delle cellule vive presenti a 24, 48 e 72 ore dalla prima conta eseguita prima della semina delle cellule nella piastra 24 well.

3.1.3 Test di tumorigenicità *in vivo*

Come evidenziato nel diagramma sottostante (Figura 6), nell'ambito delle nove linee cellulari analizzate, le linee Hep-2, PE34 e le KB hanno mostrato una maggiore capacità tumorigenica *in vivo*.

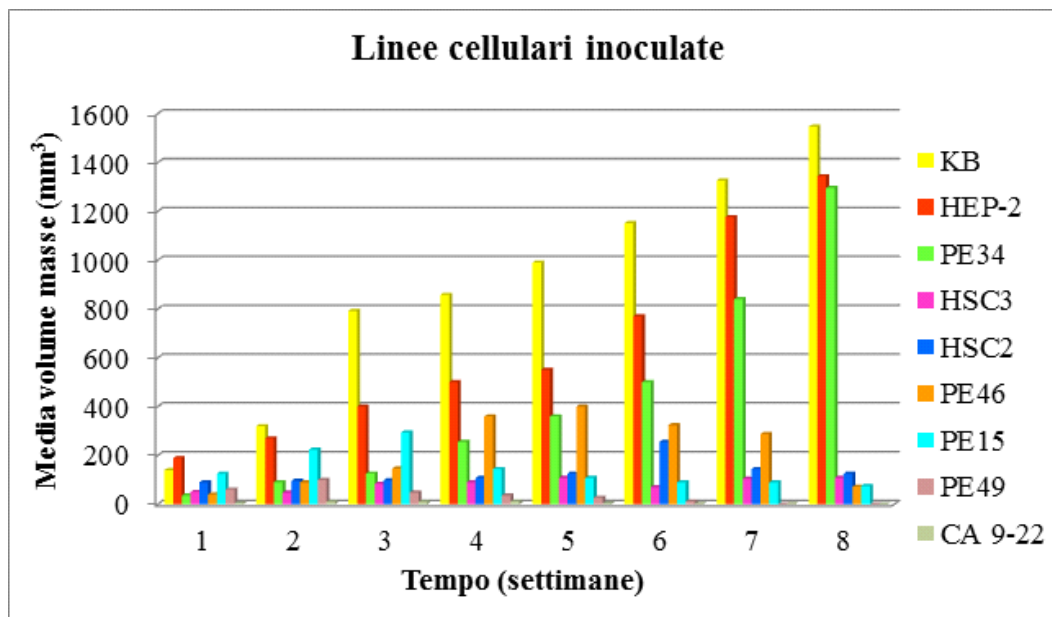
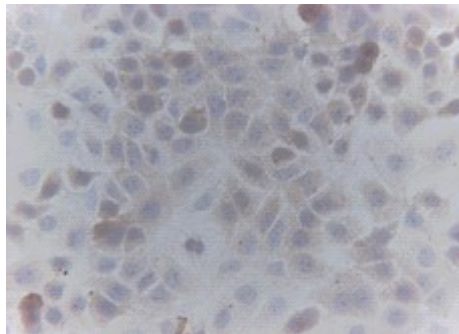


Figura 6. Diagramma a barre relativo alle misurazioni delle masse tumorali. Variazione delle dimensioni delle masse relative ai gruppi di topi inoculati con ciascuna linea cellulare durante il periodo di osservazione.

3.1.4 Analisi immunocitochimica delle linee cellulari

L'analisi immunocitochimica è stata eseguita su tutte le nove linee cellulari utilizzando gli anticorpi primari CD133/1 e CD44 alle diluizioni 1:50 e 1:60, rispettivamente. Tale analisi ha mostrato una positività di membrana e citoplasmatica al CD133 e CD44 in tutte le linee esaminate, in particolare nella linea cellulare Hep-2, dove è stata riscontrata una positività al CD133 del 3-5% e del 2-3% per il CD44 (Figura 7 A e B).

A) Hep-2 CD133



B) Hep-2 CD44

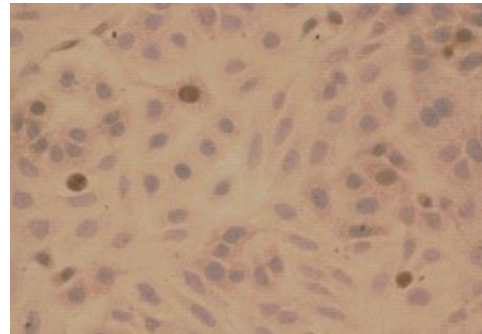


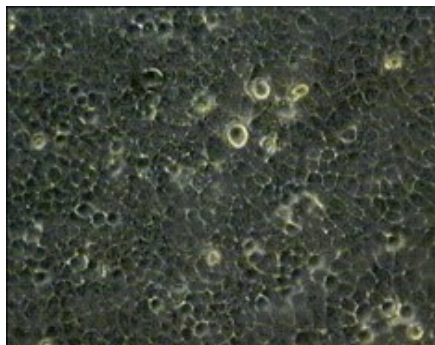
Figura 7. Analisi immunocitochimica dell'espressione di CD133 (A) e CD44 (B) nelle Hep-2.

3.2 ARRICCHIMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE CSCS NELLA LINEA CELLULARE HEP-2

3.2.1 Cellule formanti sfere

Alla luce dei risultati ottenuti, le analisi successive sono state incentrate esclusivamente sulla linea cellulare Hep-2. Tale linea è stata fatta crescere sia in mezzo di coltura contenente il 10% di siero (cellule di controllo), sia in un terreno di coltura addizionato di fattori di crescita e deprivato di siero per favorire l'arricchimento in CSCs che, in quest'ultima condizione, tenderebbero a sopravvivere formando delle colonie sferiche. Come mostrato in Figura 4, dopo circa 6 settimane le Hep-2 cresciute in assenza di siero e in presenza di fattori di crescita (cellule arricchite) hanno formato degli aggregati cellulari di forma sferica sia in adesione che in sospensione (Figura 8 A e B).

A) Hep-2 di controllo



B) Hep-2 arricchite in CSCs

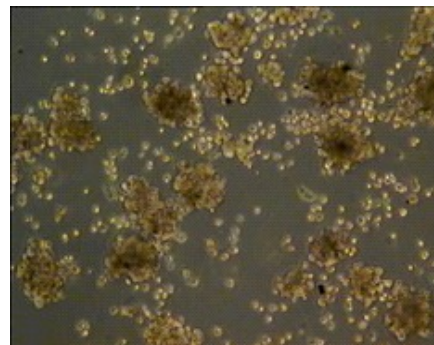
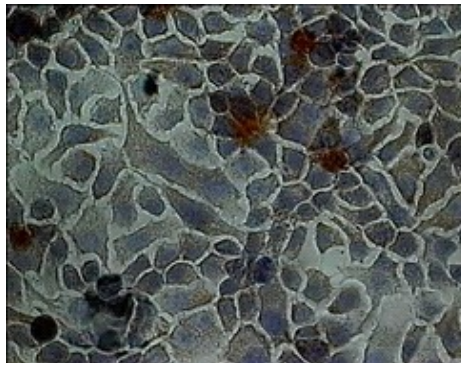


Figura 8. Le immagini mostrano come, dopo 6 settimane, le Hep-2 cresciute in assenza di siero e presenza di fattori di crescita (B) abbiano formato, diversamente dalle cellule di controllo (A), delle colonie sferiche in adesione e in sospensione.

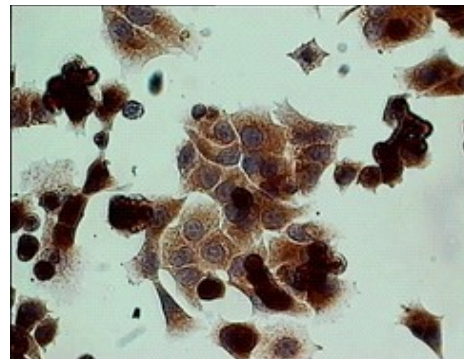
3.2.2 Analisi immunocitochimica

Sulle cellule Hep-2 cresciute in condizioni standard e sulle cellule arricchite cresciute in assenza di siero e presenza di fattori è stata eseguita l'analisi immunocitochimica per CD133 e CD44. I risultati riportati in Figura 9 mostrano una maggiore positività per i markers di staminalità nelle Hep-2 arricchite rispetto alle Hep-2 di controllo, confermando l'avvenuto arricchimento in CSCs nelle nuove condizioni di crescita.

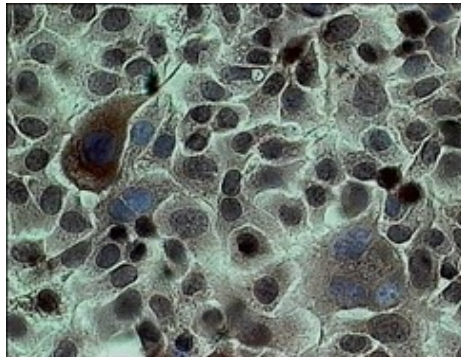
A) Hep-2 di controllo



(A) Hep-2 arricchite in CSCs



B) Hep-2 di controllo



(B) Hep-2 arricchite in CSCs

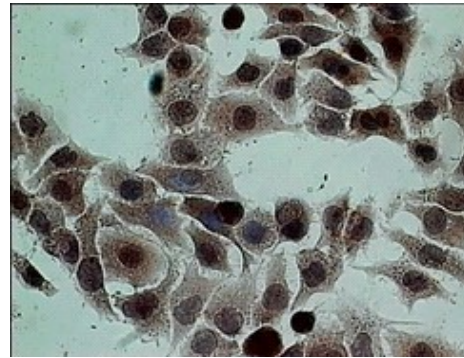


Figura 9. Le immagini evidenziano un maggiore positività per CD133 (A) e per CD44 (B) nelle Hep-2 formanti sfere rispetto alle cellule di controllo.

3.2.3 Real-Time PCR

Al fine di verificare l'avvenuto arricchimento in CSCs della linea cellulare Hep-2

nelle nuove condizioni di crescita, le cellule di controllo e le cellule arricchite sono state analizzate mediante Real-time PCR per valutare i livelli di espressione dei markers di staminalità CD133, CD44, Oct-4, Sox-2, Nanog, Nestin, ABCG2 e BMI-1. I risultati ottenuti e illustrati in Figura 6 hanno evidenziato un aumento d'espressione di tutti i markers di staminalità nelle cellule arricchite in CSCs rispetto alle cellule di controllo. Le analisi di Real-time PCR da un lato sembrerebbero confermare l'avvenuto arricchimento in CSCs delle Hep-2 nelle nuove condizioni di crescita, dall'altro hanno consentito di quantificare l'entità di tale espressione differenziale mediante il calcolo dell'espressione relativa del gene d'interesse nelle cellule arricchite rispetto alle cellule di controllo. Gli incrementi riscontrati variano da un minimo di 1,75 fino ad un massimo di 23,1 per il CD133, con un valore medio pari a 5,5.

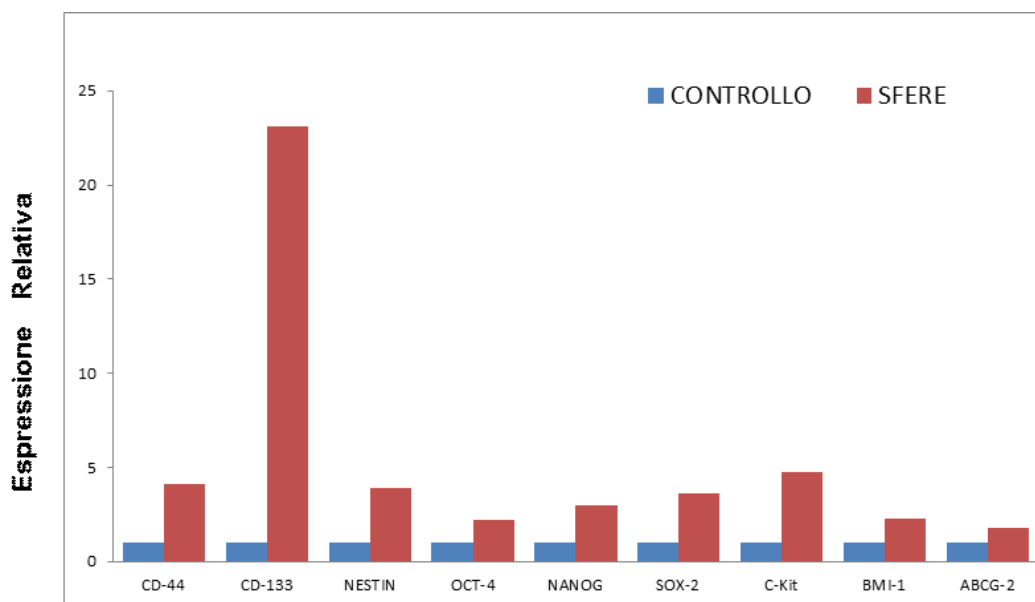


Figura 10. Livelli di espressione dei geni di staminalità nelle Hep-2 arricchite in CSCs rispetto alle cellule di controllo.

3.2.4 Analisi dell'espressione di NNMT

Al fine di fare un'analisi quantitativa dell'espressione di NNMT, i campioni cellulari sono stati analizzati con PCR Real-time. L'espressione di NNMT è 1.8 volte maggiore nella popolazione di cellule arricchite in CSCs rispetto alla controparte non arricchita. A dimostrazione di ciò, si è proceduti anche con un saggio catalitico mediante HPLC esprimendo i livelli di attività di NNMT in U/mg; da tale analisi i risultati che sono stati ottenuti sono i seguenti: 6.17 U/mg di NNMT nella popolazione di cellule arricchite CSCs contro 2.79 U/mg di NNMT nelle cellule parentali.

3.2.5 Test di tumorigenicità *in vivo*

Per valutare la tumorigenicità delle cellule Hep-2 di controllo e delle Hep-2 arricchite in CSCs, le due tipologie cellulari sono state inoculate in topi atimici e la crescita della massa tumorale è stata monitorata mediante misurazione periodica fino ad un totale di 8 settimane. Come mostrano le immagini riportate in Figura 11 (A e B), l'inoculo delle cellule Hep-2 arricchite ha portato alla formazione di masse tumorali di dimensioni maggiori rispetto alle masse formatesi in seguito all'inoculo delle cellule di controllo, evidenziando una maggiore capacità tumorigenica delle cellule arricchite (Figura 12). Dopo 8 settimane dall'inoculo i topi sono stati sacrificati e le masse tumorali sviluppatesi sono state prelevate. Una parte dei campioni è stata congelata per la caratterizzazione molecolare e una parte inclusa in paraffina per l'analisi istologica ed immunoistochimica.

A) inoculo Hep-2 di controllo



B) inoculo Hep-2 arricchite



Figura 11. Inoculo delle cellule Hep-2 di controllo e delle Hep-2 arricchite in CSCs. Le immagini mostrano le masse tumorali formatesi in seguito all'inoculo sottocutaneo in topi nudi delle cellule di controllo (A) e delle cellule arricchite in CSCs (B).

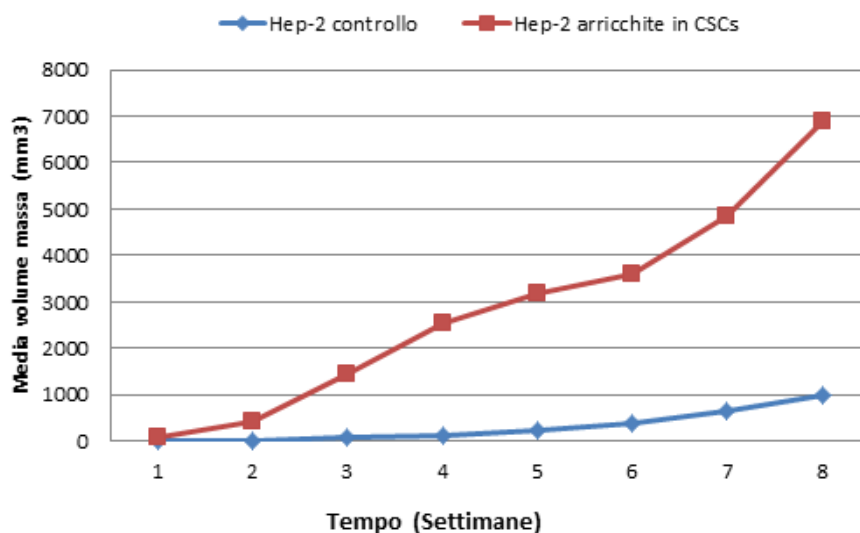
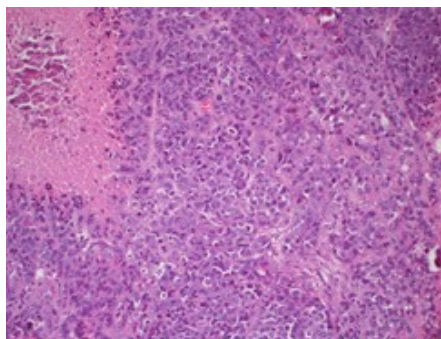


Figura 12. Curva di crescita delle masse. Media del volume delle masse (mm^3) formatesi nei topi inoculati con cellule Hep-2 di controllo e con Hep-2 arricchite in CSCs in funzione del tempo d'osservazione.

3.2.6 Analisi istologica

L'analisi istologica ha confermato che le caratteristiche dei tumori cresciuti *in vivo* riproducono quelle del tumore originale. In particolare l'esame istologico mediante la colorazione in ematossilina-eosina per le masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 di controllo ha evidenziato una neoplasia con estese aree di necrosi, costituita da cellule epiteliomorfe poco differenziate con crescita solida, caratterizzate da importanti atipie citologiche, con nuclei di grosse dimensioni in gran parte provviste di uno o più nucleoli; notevole l'attività mitotica pari a circa 28 mitosi x 5 campi ad alto ingrandimento con mitosi in gran parte atipiche. Sono presenti numerosi corpi apoptotici, concomitano cellule giganti polinucleate provviste di nucleoli eosinifili (Figura 13 A). L'esame istologico per le masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 arricchite in CSCs ha evidenziato anche in questo caso una neoplasia con estese aree di necrosi, morfologicamente simile al controllo con attività mitotica maggiore (44 mitosi x 5 campi ad alto ingrandimento, è presente una mitosi tetrapolare) (Figura 13 B).

(A) Hep-2 di controllo



(B) Hep-2 arricchite in CSCs

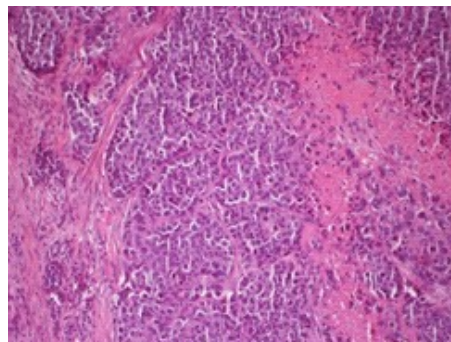
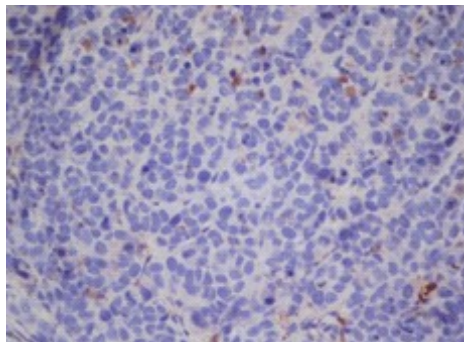


Figura 13. Analisi istologica delle sezioni delle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 di controllo (A) e delle masse formatesi a seguito dell'inoculo delle Hep-2 arricchite in CSCs (B).

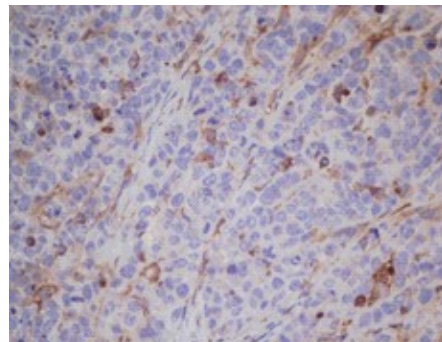
3.2.7 Analisi Immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica ha evidenziato una maggiore positività per i markers di staminalità CD133 (Hep-2 arricchite $\geq 25\%$ e Hep-2 controllo $\leq 5\%$) e CD44 (Hep-2 arricchite in $\geq 15\%$ e Hep-2 controllo 1-2%) nelle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 arricchite in CSCs rispetto alle masse formatesi in seguito all'inoculo delle Hep-2 di controllo (Figura 14 A e B).

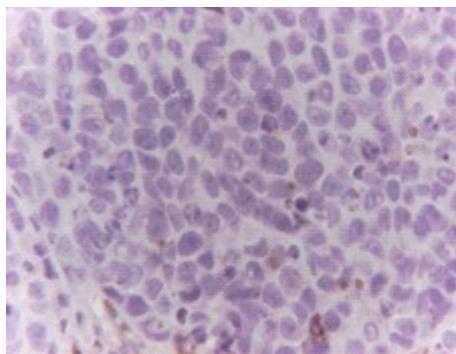
(A) Hep-2 controllo



(A) Hep-2 arricchite in CSCs



(B) Hep-2 controllo



(B) Hep-2 arricchite in CSCs

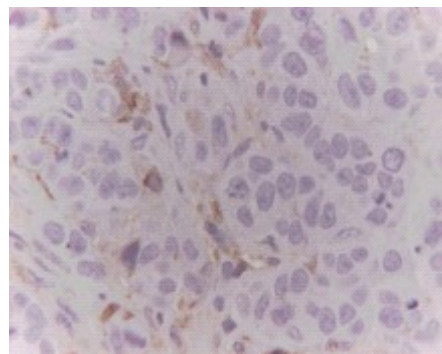


Figura 14. Colorazione immunoistochimica per i markers di staminalità CD133 (A) e CD44 (B).

3.2.8 Analisi di Real-Time PCR

L'analisi mediante Real-time PCR dei livelli d'espressione dei geni di staminalità condotta sulle masse tumorali anche in questo caso ha evidenziato una maggiore espressione di tali markers nelle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 arricchite in CSCs rispetto alle masse formatesi in seguito all'inoculo delle Hep-2 di controllo, fatta eccezione per il gene BMI-1 la cui espressione differenziale è rimasta pressoché invariata. I risultati ottenuti e riportati in Tabella 4 sembrerebbero confermare la presenza della CSCs nelle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 arricchite che sarebbero quindi le principali responsabili della formazione del tumore. Gli incrementi riscontrati variano da un minimo di 1,23 fino ad un massimo di 5,21, con un valore medio pari a 2,2.

Gene	Espressione relativa (masse Hep-2 arricchite/masse Hep-2 controllo)
CD133	1,78
CD44	1,34
Nestin	1,64
Oct-4	1,6
Nanog	5,21
Sox-2	3,71
ABCG-2	1,23
BMI-1	0,9

Tabella 5. Livelli di espressione dei geni di staminalità nelle masse tumorali relative

all'inoculo con Hep-2 arricchite rispetto a quelle ottenute dalle Hep-2 di controllo.

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La ricerca di base in campo oncologico ha cercato di comprendere a fondo i meccanismi molecolari e le alterazioni genetiche coinvolte nella patogenesi del tumore. Nell'ultimo decennio è stato dimostrato che ad iniziare la trasformazione maligna e a sostenere la crescita tumorale sia una piccola popolazione di cellule con specifiche proprietà stem-like, dette cellule staminali tumorali (cancer stem cells o CSCs).

Molti studi hanno descritto il potenziale tumorigenico delle CSCs fino ad arrivare alla formulazione della teoria delle cellule staminali tumorali secondo la quale, a sostenere la crescita del tumore e a causare recidive, sarebbe proprio questa ristretta popolazione cellulare. Alla luce di tale teoria diventa quindi prioritaria l'identificazione della popolazione staminale tumorale purificata, piuttosto che la caratterizzazione dell'intera popolazione tumorale per la ricerca di importanti bersagli terapeutici. Poter identificare e caratterizzare le cellule staminali tumorali determinerebbe infatti progressi significativi nel campo della ricerca sul cancro.

L'obiettivo del presente lavoro di ricerca è stato pertanto l'arricchimento e la caratterizzazione fenotipica e molecolare delle CSCs nelle Hep-2, una linea cellulare di carcinoma umano della laringe.

La prima fase del lavoro sperimentale è stata volta ad analizzare linee tumorali commerciali di carcinomi della regione testa-collo (HNSCC). La caratterizzazione delle linee cellulari è stata effettuata valutando la velocità di replicazione e la capacità tumorigenica *in vivo*. È stato inoltre valutato il livello di espressione dei marcatori di staminalità CD133 e CD44 mediante analisi immunocitochimica. Delle linee cellulari analizzate la linea cellulare Hep-2 è risultata essere tra le più tumorigeniche ed esprimersi i markers di staminalità. Per tali ragioni è stata selezionata per effettuare

l'arricchimento in CSCs. Nel contempo si è valutata l'efficacia di alcune metodiche avanzate tecnologicamente come il MACS (magnetic-activated cell sorting) e il FACS (fluorescence-activated cell sorting) per selezionare le CSC. Per valutare l'efficienza della separazione magnetica, le cellule raccolte sono state analizzate con citometria a flusso. Dopo l'isolamento, la frazione di cellule CD133(+) era del 10.26% +/- 1.9%. Per tali motivi si è poi deciso di selezionare le CSCs applicando una metodica di arricchimento che prevede la crescita nel terreno di coltura privo di siero e addizionato di specifici .

Nella seconda fase del progetto le Hep-2 sono state analizzate per la ricerca di CSCs utilizzando, come detto, la metodica di arricchimento che prevede la crescita nel terreno di coltura privo di siero e addizionato di specifici fattori quali il bFGF (human recombinant basic fibroblastic growth factor) e l'hrEGF (human recombinant epidermal growth factor) . Nel tentativo di caratterizzare da un punto di vista molecolare le CSCs, sono state eseguite analisi dei livelli espressione di specifici marcatori di staminalità mediante immunocitochimica e Real-Time PCR. I risultati ottenuti in seguito a tali analisi hanno confermato l'avvenuto arricchimento in CSCs. La linea cellulare Hep-2 arricchita in CSCs mostrava infatti una maggiore espressione dei markers di staminalità rispetto al controllo.

La terza fase del lavoro sperimentale ha previsto la valutazione *in vivo* della capacità tumorigenica della linea cellulare Hep-2 arricchita in CSCs. Le cellule di controllo e le cellule arricchite sono state inoculate sottocute sul dorso di topi nudi a diverse concentrazioni. L'inoculo delle Hep-2 arricchite ha portato alla formazione di masse tumorali di maggiori dimensioni rispetto a quelle formatesi in seguito all'inoculo delle Hep-2 di controllo, a dimostrazione di una maggiore tumorigenicità delle cellule arricchite. La maggiore attività tumorigenica delle Hep-2 arricchite in CSCs è stata confermata dall'esame istologico delle sezioni

delle masse che ha indicato una loro maggiore attività proliferativa rispetto alla linea di controllo. I risultati ottenuti mediante l'analisi immunistochemica per CD133 e CD44 hanno evidenziato una maggiore espressione di tali markers di staminalità nelle masse ottenute dall'inoculo effettuato con le cellule arricchite in CSCs rispetto a quella relativa alle cellule di controllo. Tali risultati sembrerebbero confermare la presenza della CSCs nelle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 arricchite che sarebbero quindi le responsabili della formazione e aggressività del tumore. A carico delle masse ottenute è stato inoltre valutato il livello di espressione di marcatori di staminalità mediante Real-Time PCR. I risultati ottenuti hanno evidenziato una maggiore espressione di tali markers nelle masse derivanti dall'inoculo delle Hep-2 arricchite in CSCs rispetto alle masse formatesi in seguito all'inoculo delle Hep-2 di controllo, fatta eccezione per il gene BMI-1 la cui espressione differenziale è rimasta pressoché invariata.

I risultati ottenuti dall'analisi mediante Real-Time PCR, eseguita sia sulla linea cellulare Hep-2 sia sulle masse tumorali, hanno mostrato una sostanziale overespressione dei markers di staminalità nelle cellule arricchite rispetto alle cellule di controllo. Sarebbe interessante estendere tale analisi ai geni appartenenti al pathway WNT, allo scopo di valutare una loro eventuale disregolazione. E' infatti noto che alcune vie del segnale che regolano la proliferazione cellulare e la trasduzione del segnale, sono spesso attivate in maniera aberrante nel tumore . In particolare la via Wnt/ β -catenina sembra essere importante nel processo di tumorigenesi in quanto è stata dimostrata essere determinante nella regolazione dell'autorinnovamento delle cellule staminali ematopoietiche e di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare . Lo studio di ulteriori pathways quali Notch,

Hedgehog, PTEN e BMI-1 sarà necessario per la comprensione dei meccanismi molecolari che caratterizzano il destino delle CSCs.

Sono state eseguite delle indagini su NNMT, che catalizza la N-metilazione di nicotinammide, piridine, e analoghi, giocando poi un ruolo fondamentale nella biotrasformazione di molti xenobiotici . Recenti studi hanno mostrato che in presenza di tumore, l'espressione della proteina NNM risulta aumentata, come ad esempio nel glioblastoma , nell'adenocarcinoma dello stomaco , del rene e del carcinoma orale a cellule squamose ; inoltre i suoi livelli di espressione possono correlarsi in maniera inversamente proporzionale alle dimensioni del tumore, come se quest'enzima fosse coinvolto proprio nella crescita e nello sviluppo del tumore stesso. Inoltre nell'OSCC, l'upregolazione di NNMT è inversamente correlabile a pT, metastasi linfonodali e allo staging patologico. In questo studio abbiamo voluto valutare anche nelle CSCs l'espressione mRNA e l'attività catalitica di NNMT. La nostra analisi ha rivelato una sovraespressione di NNMT nella popolazione Hep-2 CSCs-arricchita rispetto alla controparte non arricchita. In linea con i risultati della PCR Real-Time, i livelli di attività NNMT sono risultati particolarmente elevati nelle cellule CSCs rispetto alle cellule parentali. Prendendo in considerazione l'importanza delle CSC nei processi di cancerogenesi e di insorgenza delle metastasi, i risultati da noi ottenuti farebbero pensare ad un ruolo particolarmente importante a carico dell'NNMT nel metabolismo della cellula tumorale e quindi alla possibilità di utilizzare l'inibizione dell'NNMT quale approccio molecolare nel trattamento della neoplasia.

Il presente lavoro di ricerca ha consentito di mettere a punto una metodica di arricchimento in CSCs che prevede la crescita delle cellule in un mezzo di coltura

deprivato di siero e addizionato di specifici fattori di crescita, arricchimento che è stato confermato mediante analisi immunocitochimica e analisi d'espressione genica di specifici marcatori di staminalità. Analisi su un numero più elevato di campioni tissutali e cellulari di diverse tipologie di tumore saranno utili per confermare i risultati ottenuti.

L'identificazione e la caratterizzazione delle CSCs è di fondamentale importanza nel campo della ricerca sul cancro, in quanto diversi studi suggeriscono che le cellule staminali tumorali sono caratterizzate da una elevata resistenza ai chemioterapici e alla radioterapia. Tale proprietà sostiene l'ipotesi secondo la quale tali cellule possano essere responsabili della progressione e della recidiva del tumore. Pertanto, le CSCs potrebbero rappresentare degli effettivi bersagli terapeutici contro i quali sviluppare nuovi farmaci antineoplastici, che abbiano la potenzialità di eradicare completamente il cancro.

L'attuale identificazione delle CSCs si basa sull'espressione di specifici markers di superficie il cui ruolo nell'ambito della cancerogenesi risulta ancora poco chiaro. Successivi esperimenti di silenziamento genico mediante shRNA a carico dei principali marcatori di staminalità potrebbero risultare utili al fine di stabilire il ruolo di tali markers nel processo di tumorigenesi.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Monroe, M.M., et al., *Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma*. J Oncol, 2011. **2011**: p. 762780.
2. He, S., D. Nakada, and S.J. Morrison, *Mechanisms of stem cell self-renewal*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2009. **25**: p. 377-406.
3. Clarke, M.F. and M. Fuller, *Stem cells and cancer: two faces of eve*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1111-5.
4. Tsai, R.Y. and R.D. McKay, *A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells*. Genes Dev, 2002. **16**(23): p. 2991-3003.
5. Potten, C.S. and M. Loeffler, *Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt*. Development, 1990. **110**(4): p. 1001-20.
6. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
7. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
8. Morrison, S.J. and A.C. Spradling, *Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life*. Cell, 2008. **132**(4): p. 598-611.
9. Mitalipov, S. and D. Wolf, *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 185-99.
10. Mayani, H. and P.M. Lansdorp, *Proliferation of individual hematopoietic progenitors purified from umbilical cord blood*. Exp Hematol, 1995. **23**(14): p. 1453-62.
11. Uchida, N., et al., *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14720-5.
12. Thill, M., et al., *A novel population of repair cells identified in the stroma of the human cornea*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(5): p. 733-45.
13. Herrera, M.B., et al., *Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2840-50.
14. Richardson, G.D., et al., *CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 16): p. 3539-45.

15. Tang, B., et al., *Tec kinase associates with c-kit and is tyrosine phosphorylated and activated following stem cell factor binding*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8432-7.
16. Tay, Y., et al., *MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1124-8.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
18. Greaves, M. and C.C. Maley, *Clonal evolution in cancer*. Nature, 2012. **481**(7381): p. 306-13.
19. Clevers, H., *Stem cells, asymmetric division and cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(10): p. 1027-8.
20. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
21. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 675-99.
22. Alison, M.R., et al., *Stem cell plasticity and tumour formation*. Eur J Cancer, 2006. **42**(9): p. 1247-56.
23. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
24. Sarry, J.E., et al., *Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgamma-deficient mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(1): p. 384-95.
25. Li, F., et al., *Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis*. Cell Res, 2007. **17**(1): p. 3-14.
26. R., V., *die cellular pathologie in ihrer begrundung auf physiologische und pathologische gewebelehre*, in August Hirschwarld. 1858.
27. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
28. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
29. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
30. Fang, D., et al., *A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9328-37.

31. Tirino, V., et al., *Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3469.
32. Tirino, V., et al., *Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo*. FASEB J, 2011. **25**(6): p. 2022-30.
33. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
34. Bapat, S.A., et al., *Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 3025-9.
35. Takaishi, S., et al., *Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44*. Stem Cells, 2009. **27**(5): p. 1006-20.
36. Eramo, A., et al., *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 504-14.
37. Tirino, V., et al., *Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization*. FASEB J, 2013. **27**(1): p. 13-24.
38. Tajbakhsh, S., *Stem cell identity and template DNA strand segregation*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(6): p. 716-22.
39. Lee, J.T. and M. Herlyn, *Old disease, new culprit: tumor stem cells in cancer*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 603-9.
40. Moltzahn, F.R., et al., *"Cancer stem cells"-lessons from Hercules to fight the Hydra*. Urol Oncol, 2008. **26**(6): p. 581-9.
41. Dean, M., T. Fojo, and S. Bates, *Tumour stem cells and drug resistance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 275-84.
42. Prince, M.E., et al., *Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 973-8.
43. Albers, A.E., et al., *Stem cells in squamous head and neck cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2012. **81**(3): p. 224-40.
44. Zhang, Q., et al., *A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy*. Cancer Lett, 2010. **289**(2): p. 151-60.
45. Wei, X.D., et al., *In vivo investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line*. Head Neck, 2009. **31**(1): p. 94-101.
46. Moserle, L., et al., *The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects*. Cancer Res, 2008. **68**(14): p. 5658-68.

47. Ozvegy-Laczka, C., et al., *Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters*. Drug Resist Updat, 2005. **8**(1-2): p. 15-26.
48. Bleau, A.M., J.T. Huse, and E.C. Holland, *The ABCG2 resistance network of glioblastoma*. Cell Cycle, 2009. **8**(18): p. 2936-44.
49. Loebinger, M.R., et al., *Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade*. Br J Cancer, 2008. **98**(2): p. 380-7.
50. Awad, O., et al., *High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13943.
51. Russo, J.E. and J. Hilton, *Characterization of cytosolic aldehyde dehydrogenase from cyclophosphamide resistant L1210 cells*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 2963-8.
52. Ohi, Y., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer*. Histopathology, 2011. **59**(4): p. 776-80.
53. Visus, C., et al., *Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10538-45.
54. Clay, M.R., et al., *Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase*. Head Neck, 2010. **32**(9): p. 1195-201.
55. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss, *A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes*. J Neurosci, 1992. **12**(11): p. 4565-74.
56. Rybak, A.P., et al., *Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 683-94.
57. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
58. Pastrana, E., V. Silva-Vargas, and F. Doetsch, *Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(5): p. 486-98.
59. Okamoto, A., et al., *Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Oral Oncol, 2009. **45**(7): p. 633-9.
60. Chiou, S.H., et al., *Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4085-95.

61. Tang, C., B.T. Ang, and S. Pervaiz, *Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy*. FASEB J, 2007. **21**(14): p. 3777-85.
62. Rajan, P. and R. Srinivasan, *Targeting cancer stem cells in cancer prevention and therapy*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(3): p. 211-6.
63. Zhao, R.C., Y.S. Zhu, and Y. Shi, *New hope for cancer treatment: exploring the distinction between normal adult stem cells and cancer stem cells*. Pharmacol Ther, 2008. **119**(1): p. 74-82.
64. Marshall, J.R., et al., *Smoking, alcohol, dentition and diet in the epidemiology of oral cancer*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1992. **28B**(1): p. 9-15.
65. Hobbs, C.G., et al., *Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis*. Clin Otolaryngol, 2006. **31**(4): p. 259-66.
66. Bonadonna G, R.D.C.G., Valagussa P, *Medicina oncologica (8ª edizione)*, 2007(Elsevier Masson).
67. Almadori, G., et al., *Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach*. Eur J Cancer, 2005. **41**(5): p. 683-93.
68. Robbins, C., *LE BASI PATOLOGICHE DELLE MALATTIE*. Vol. 2. 2011.
69. Licitra, L., et al., *Cancer of the larynx*. Crit Rev Oncol Hematol, 2003. **47**(1): p. 65-80.
70. Marioni, G., et al., *Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma*. Cancer Treat Rev, 2006. **32**(7): p. 504-15.
71. Loo, S.W., K. Geropantas, and T.W. Roques, *Functional organ preservation in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma: is there a role for induction chemotherapy?* Clin Oncol (R Coll Radiol), 2013. **25**(5): p. 298-307.
72. Kamata, N., et al., *Growth of normal oral keratinocytes and squamous cell carcinoma cells in a novel protein-free defined medium*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(10): p. 635-41.
73. Villen, J. and S.P. Gygi, *The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry*. Nat Protoc, 2008. **3**(10): p. 1630-8.
74. Lim, Y.C., et al., *Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol, 2011. **47**(2): p. 83-91.
75. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
76. Attatippaholkun, W.H., et al., *A novel method for the preparation of large cDNA fragments from dengue-3 RNA genome by long RT-PCR amplification*. Southeast

Asian J Trop Med Public Health, 2000. **31 Suppl 1**: p. 126-33.

77. Emanuelli, M., et al., *Nicotinamide N-Methyltransferase upregulation correlates with tumour differentiation in oral squamous cell carcinoma*. *Histol Histopathol*, 2010. **25**(1): p. 15-20.
78. Hertz, R., *Biotin and the avidin-biotin complex*. *Physiol Rev*, 1946. **26**(4): p. 479-94.
79. Cusi, M.G., M. Valassina, and P.E. Valensin, *Comparison of M-MLV reverse transcriptase and Tth polymerase activity in RT-PCR of samples with low virus burden*. *Biotechniques*, 1994. **17**(6): p. 1034-6.
80. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(12): p. 895-902.
81. Gil, J., et al., *Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy*. *J Appl Genet*, 2008. **49**(2): p. 193-9.
82. Beachy, P.A., S.S. Karhadkar, and D.M. Berman, *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 324-31.
83. Wang, Y., et al., *The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML*. *Science*, 2010. **327**(5973): p. 1650-3.
84. Aksoy, S., C.L. Szumlanski, and R.M. Weinshilboum, *Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(20): p. 14835-40.
85. Markert, J.M., et al., *Differential gene expression profiling in human brain tumors*. *Physiol Genomics*, 2001. **5**(1): p. 21-33.
86. Sartini, D., et al., *Identification of nicotinamide N-methyltransferase as a novel tumor marker for renal clear cell carcinoma*. *J Urol*, 2006. **176**(5): p. 2248-54.
87. Sartini, D., et al., *Analysis of tissue and salivary nicotinamide N-methyltransferase in oral squamous cell carcinoma: basis for the development of a noninvasive diagnostic test for early-stage disease*. *Biol Chem*, 2012. **393**(6): p. 505-11.

6 ABBREVIAZIONI

bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	DNA complementare
CSC	Cancer stem cell
Ct	Threshold cycle
DNA	Deossiribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovin serum
GOI	Gene of interest
HKG	Housekeeping gene
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
hrEGF	Human recombinant epidermal growth factor
MACS	Magnetic-activated cell sorting
PBS	Phosphate buffered saline
PBSA	BSA in PBS
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
SP	Side population

Non è facile citare e ringraziare, in poche righe, tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questa tesi, chi con una collaborazione costante, chi con un supporto morale o materiale, chi con consigli e suggerimenti o solo con parole di incoraggiamento.

La mia immensa gratitudine va al mio Tutor, il Prof. Lo Muzio, per avermi guidato in questo percorso di ricerca con costante disponibilità ed interesse ed avermi seguito e supportato nella realizzazione della tesi.

Un sincero ringraziamento a tutti in Clinica, per l'atmosfera serena e piacevole che ha contraddistinto ogni giorno trascorso qui.

Infine ringrazio la mia famiglia: una ricchezza inesauribile e immensa.

