



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTÀ DI MEDICINA E ODONTOIATRIA
(Presidente: Prof. Sebastiano Filetti)

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE
(DIRETTORE: Prof. Massimo Monti)

**Dottorato di Ricerca in “Tecnologie avanzate in
Chirurgia”**
(Coordinatore: Prof. Vito D’Andrea)

TESI SPERIMENTALE

***“Ricerca di cellule staminali tumorali nel
carcinoma coloretale”***

Relatore: Prof. Vito D’ANDREA

Correlatore: Prof. Angelo FILIPPINI

Dottoranda: Dott.ssa Maya TONDA

Anno Accademico 2016 – 2017

INDICE

SOMMARIO	pag. 3
INTRODUZIONE.....	pag. 6
MATERIALI E METODI	pag. 13
RISULTATI.....	pag. 18
DISCUSSIONE.....	pag. 21
CONCLUSIONI.....	pag. 26
BIBLIOGRAFIA	pag. 29

SOMMARIO

Il tumore del colon-retto rappresenta il tumore più frequente dell'apparato digerente; è la seconda causa di morte dopo quello del polmone nell'uomo, e quello mammario nella donna. La massima incidenza si ha tra i 60 ed i 70 anni (più elevata in USA e nell'Europa Orientale). La malattia colpisce uomini e donne con uguale frequenza, sebbene i tumori del retto mostrino una maggiore prevalenza nel sesso maschile. Nella popolazione della Comunità Europea sopra i 65 anni l'incidenza stimata per il tumore del retto è di 95 nuovi casi/anno per 100.000 uomini e di 53 nuovi casi/anno per 100.000 donne. Ogni anno nel nostro Paese circa 27.000 persone si ammalano di tumore del colon-retto e, di queste, poco più della metà muore a causa della malattia. La sopravvivenza a cinque anni supera il 50%.

La terapia è fondamentalmente chirurgica/chemioterapica e le prospettive di ricerca sul ruolo delle cellule staminali tumorali (CST) nel cancro sono ampie. In molti istotipi di cancro, è stato dimostrato che le CST determinano l'aggressività della malattia neoplastica; la ricerca delle CST nel carcinoma coloretale (CCR) è importante ai fini prognostici e terapeutici. Infatti le metastasi sono la principale causa di morte legata al cancro e determinano la transizione dalla malattia neoplastica localizzata alla malattia neoplastica sistemica.

La scoperta delle CST (cellule staminali tumorali) rappresenta una strategia per il controllo e la prevenzione della malattia metastatica

conclamata. La caratterizzazione molecolare delle CST può consentire di individuare bersagli farmacologici e terapie personalizzate antimetastatiche. Mentre nel cancro della mammella, del polmone e della prostata le CST sono state ampiamente caratterizzate, nel cancro del colon-retto queste caratteristiche molecolari sono ancora da scoprire. Pertanto, lo sviluppo dei modelli in vitro e in vivo per l'espansione e l'analisi delle CST coloretali è di primaria importanza per identificare nuovi approcci prognostici e terapeutici.

In questo studio sperimentale, abbiamo ricercato le CST in 22 cancri coloretali asportati chirurgicamente.

Nei materiali e metodi, sono ampiamente descritte le tecnologie utilizzate per la ricerca delle CST.

La ricerca ha dato risultati positivi in 5 pazienti: 1 cancro del cieco, 1 cancro del colon ascendente, 2 cancri del colon trasverso, 1 cancro del retto.

Le linee cellulari che si sono sviluppate dalle CST scoperte nei 5 pazienti si trovano nella Banca delle CST dell'Istituto Superiore di Sanità e vengono utilizzate per numerosi esperimenti.

Questi pazienti hanno avuto una prognosi peggiore rispetto agli altri, a conferma del ruolo prognostico negativo delle CST.

La ricerca si propone quindi di individuare precocemente questi pazienti per poterli sottoporre ad un follow up più stretto e realizzare

terapie mirate che abbiano come target specifico le CST, ritenute responsabili dell'aggressività e dell'eventuale recidiva di malattia.

INTRODUZIONE

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che i tumori solidi sono generati e mantenuti da una piccola popolazione di cellule tumorali indifferenziate capaci di proliferare indefinitamente e di dare origine ad una progenie di cellule differenziate. Questa sottopopolazione di cellule tumorigeniche è anche coinvolta nei processi di resistenza ai trattamenti terapeutici correntemente utilizzati in ambito clinico e nel fenomeno della metastatizzazione.

Studi effettuati sulle leucemie mieloidi acute [1, 2] hanno fornito le prime evidenze sperimentali circa l'organizzazione gerarchica delle cellule che costituiscono un tumore, individuando la presenza di una popolazione cellulare con caratteristiche di staminalità e dando l'avvio ad una serie di studi finalizzati a verificare l'esistenza di questa popolazione cellulare nei tumori solidi.

Nell'ultimo decennio evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza, all'interno della massa tumorale, (di un certo numero di neoplasie solide) di una sottopopolazione di cellule tumorigeniche responsabile dell'insorgenza e del mantenimento del tumore. Queste cellule sono state denominate "cellule staminali tumorali" (CST o "cellule inizianti il tumore" o CSC) in quanto hanno dimostrato di avere un potenziale proliferativo illimitato, la capacità di autorinnovarsi e di riprodurre il tumore umano in animali da esperimento (*Fig. 1*).

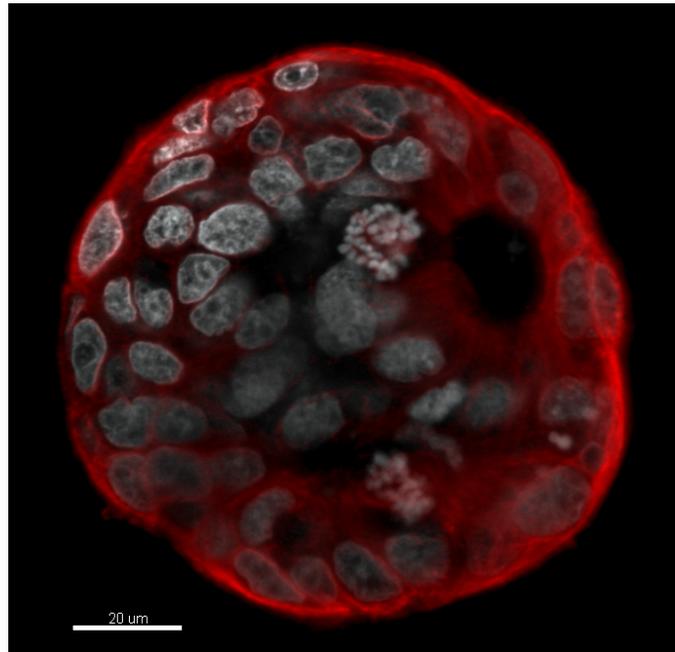


Fig. 1 – Colosfera
(Zeuner A. et al. Cell Stem Cell 2014)

Molti tumori presentano un'organizzazione di tipo gerarchico, con all'apice un gruppo di cellule immature, dette cellule staminali tumorali, in grado di mantenere costante il proprio numero e di dare origine ad una progenie diversificata di cellule tumorali. Solitamente rappresentano una minoranza all'interno di un tumore ma possiedono tre principali caratteristiche:

- 1) sono indispensabili per la crescita del tumore perché generano tutte le altre cellule tumorali;
- 2) sono resistenti ai farmaci antitumorali: spesso sopravvivono alla chemioterapia e rigenerano il tumore dopo mesi o anni;
- 3) sono responsabili della formazione di metastasi.

Se le CST sono le “madri” di tutte le cellule, potenzialmente metastatiche, che popolano la massa tumorale, solo distruggendole si potrà eliminare definitivamente il tumore. Viceversa, se la terapia non riuscirà ad eliminare le CST ma solo le cellule tumorali figlie, il tumore prima o poi si riformerà; rappresentano, pertanto, il primo bersaglio da colpire [3].

Nel 2003, le CST sono state identificate nel tumore della mammella e in alcuni tumori cerebrali. Nel 2007 sono state scoperte nei tumori dell'intestino e del pancreas; negli anni successivi nel tumore della prostata, del polmone, della tiroide, dello stomaco, del rene, dell'ovaio e della vescica. L'ipotesi è che le cellule staminali tumorali di un tumore derivino dalle staminali del tessuto in cui il tumore si è sviluppato, in seguito ad un processo di mutazione o di trasformazione maligna.

Le staminali tumorali potrebbero derivare da una categoria di cellule chiamate progenitori. Questi sono i primi discendenti delle cellule staminali e possiedono una grande capacità di dividersi ma – contrariamente alle staminali – dopo un certo periodo di tempo muoiono. Se una cellula progenitrice va incontro a trasformazione maligna può acquisire l'immortalità e diventare a tutti gli effetti una cellula staminale tumorale. Distruggere le CST è una delle sfide più grandi per gli scienziati che fanno ricerca sul cancro. Uno dei tanti ostacoli è rappresentato dal fatto che le CST sono resistenti alla chemio ed alla radioterapia. Fra le loro specialità infatti c'è anche una

particolare capacità di espellere velocemente i farmaci e di riparare con grande efficienza i danni provocati dalle radiazioni.

Le cellule staminali embrionali e adulte sono, infatti, dotate di una capacità superiore per prevenire l'accumulo di lesioni genetiche, ripararle o evitare la loro propagazione alle cellule figlie (il che sarebbe particolarmente dannoso per l'intero organismo). Le cellule staminali pluripotenti inducibili mostrano anche una risposta al danno del DNA ma la stabilità del loro genoma è spesso condizionata dalla storia mutazionale della popolazione cellulare di origine, che costituisce un ostacolo alle applicazioni cliniche. Le cellule staminali del cancro sono particolarmente tolleranti ai danni del DNA e non subiscono la senescenza o la morte cellulare regolata al momento dell'accumulo di lesioni genetiche. Tale resistenza contribuisce alla deriva genetica dei tumori in evoluzione e alla loro limitata sensibilità alla chemioterapia e alla radioterapia [4].

Spesso inoltre le staminali tumorali si dividono poco e, di conseguenza, sono poco attaccabili dalla chemioterapia, che invece colpisce soprattutto le cellule che si dividono velocemente. Individuati i processi e le caratteristiche su cui le cellule staminali tumorali basano la loro sopravvivenza, si potranno sviluppare nuove terapie mirate che colpiscano efficacemente le cellule staminali tumorali senza danneggiare quelle normali. Tuttavia, non tutte le CST possono avere lo stesso valore clinico poiché solo una frazione è in grado di produrre metastasi.

L'obiettivo di questo progetto è quello di isolare le cellule tumorigeniche a partire da tumori coloretali per lo sviluppo di terapie mirate. Chiarito il ruolo delle CST e della loro implicazione nell'oncogenesi potremo giocare un ruolo fondamentale nella gestione dei pazienti affetti da cancro del colon retto, identificando nuove prospettive per farmaci chemioterapici e specifici marcatori tumorali per prevenire e monitorare recidive e metastasi.

I nostri obiettivi, sono: primo, l'identificazione ed il monitoraggio delle sottopopolazioni di CST tumorigeniche attraverso l'espressione di marcatori legati alla staminalità cellulare che offrirà per la prima volta una valutazione di CST dei pazienti con metastasi da CCR, prevedendo potenzialmente un mezzo per pazienti in follow up. Quindi, la possibilità di espandere cellule metastatiche sia in vitro che in vivo offrirà una possibilità unica di valutare terapie sperimentali e combinazioni di farmaci selezionati sulla popolazione di cellule tumorigeniche, spianando la strada ad un effettivo bersaglio di cellule chemioresistenti. In sintesi, il risultato atteso da questo progetto potrebbe fornire informazioni sul ruolo delle CST nella formazione delle metastasi e permettere di creare nuovi mezzi che possono migliorare le procedure esistenti per il follow up ed il trattamento clinico dei pazienti con CCR.

Le cellule staminali (nei tessuti normali e nei tumori) possono assumere fenotipo proliferativo o quiescente. Nei tessuti normali, contribuiscono all'equilibrio omeostatico del tessuto mentre le cellule

staminali dormienti si dedicano alla riparazione dei tessuti dopo l'insulto. Allo stesso modo la divisione delle cellule staminali tumorali (CST) stimola la progressione del tumore mentre le cellule staminali tumorali quiescenti resistono agli insulti citotossici e ripopolano il tumore dopo la chemioterapia. Sono rari ma possono diventare la popolazione CST prevalente dopo trattamenti citotossici.

La quiescenza rappresenta una strategia di sopravvivenza adottata dalle cellule staminali tumorali (CST) per resistere alle dure condizioni ambientali e agli insulti citotossici. Recenti studi dimostrano che le CST quiescenti (*Fig. 2*) si trovano in uno stato metabolico “basso”.

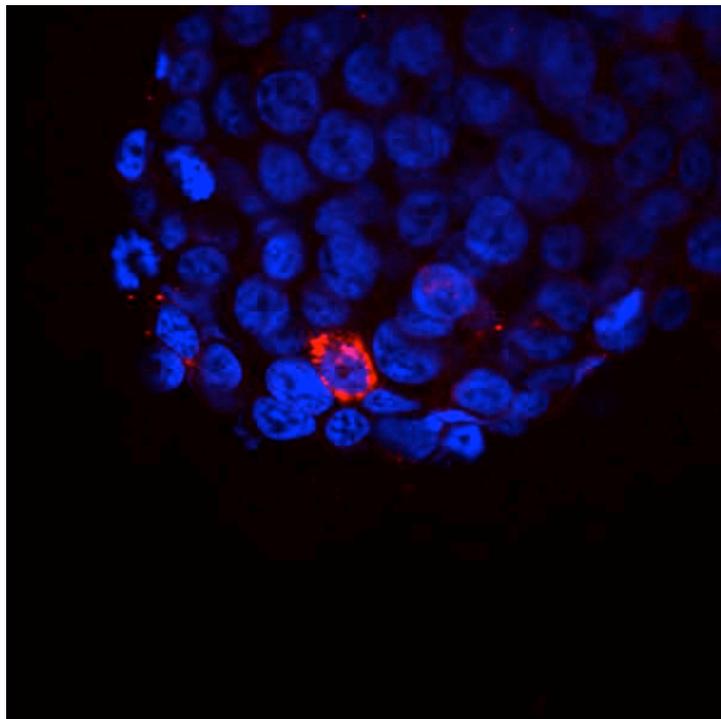


Fig. 2 - CST quiescente

(Zeuner A. The secret life of quiescent cancer stem cells. Mol Cell Oncol. 2015)

Questo stato di "bassa energia" probabilmente consente alle CST quiescenti di persistere in situazioni difficili come bassi livelli di ossigeno e scarsità di nutrienti, due condizioni che sono frequentemente incontrate dalle cellule tumorali [5].

L'identificazione delle cellule staminali tumorali ha profondamente influenzato l'approccio della ricerca oncologica nel tentativo di sviluppare terapie più efficaci. Pertanto, le cellule staminali tumorali rappresentano il bersaglio elettivo per nuovi farmaci ad azione mirata ed offrono un vantaggio potenzialmente rivoluzionario nel trattamento del cancro in quanto la loro eliminazione potrebbe portare all'eradicazione del tumore.

In questo studio, abbiamo sviluppato una ricerca che ci ha permesso di isolare ed espandere *in vitro* cellule staminali tumorali da CCR.

MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti campioni di tessuti tumorali dai carcinomi coloretali operati (*Fig. 3*): la procedura è stata effettuata da personale dedicato (chirurghi, anatomico-patologi, biologi) che ha isolato 1 cm³ di mucosa sana, distante dalla sede del tumore ed 1 cm³ di lesione tumorale. I campioni sono stati conservati e trasportati in apposite provette, separate. Il pezzo operatorio è stato poi sottoposto ad esame anatomico-patologico definitivo come di routine (dallo stesso personale che aveva prelevato i campioni da 1 cm³, proprio per evitare che il pezzo operatorio, restante, non risultasse insufficiente).

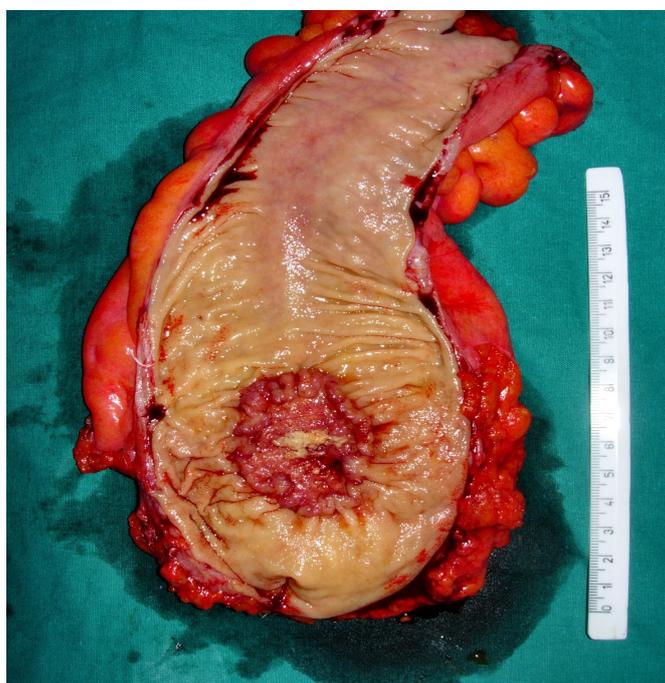


Fig. 3 - Preparato chirurgico di resezione anteriore del retto

Colture cellulari ed espansione delle cellule staminali tumorali

I campioni di tessuto sono stati raccolti da un patologo immediatamente dopo l'intervento di ciascun paziente, lavati rapidamente 2-3 volte in soluzione salina fredda, quindi trasferiti nel mezzo di Eagle modificato di Dulbecco (DMEM) contenente il 3% di soluzione di penicillina-streptomina-amfotericina B e conservata in questo terreno a 4 ° C fino all'elaborazione entro 24-48 ore. Per la dissociazione del tessuto, i campioni di CCR sono stati prima lavati 3-4 volte in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), quindi tagliati con una pinza e / o un bisturi in pezzi di circa 0,5 mm o più piccoli. I frammenti sono stati ulteriormente lavati due volte mediante centrifugazione a 150 g per 3 minuti, quindi incubati in DMEM (Thermo Fisher Scientific) con 1,5 mg / ml di collagenasi di tipo II (Thermo Fisher Scientific) e 20 µg / ml di DNase per 1 ora a 37 ° C sotto agitazione.

La sospensione cellulare è stata quindi filtrata attraverso una rete di nylon da 100 µm e lavata mediante 2 ulteriori fasi di centrifugazione in DMEM. Infine, pellet contenenti cellule, cluster di cellule e frammenti di tessuto sono stati risospesi in terreno CSC integrato con 10 mM di nicotinamide, 1 µM Y-27632, 20 ng / ml di EGF umano e fattore di crescita dei fibroblasti umani di base di 10 ng / ml. La sospensione risultante è stata placcata in flaconi di coltura tissutale a fessaggio ultra-basso e coltivata in atmosfera umidificata a 37 ° C, 5%

di CO₂. Ogni 2 o 3 giorni, metà del mezzo di coltura è stato aggiornato. Nelle prime settimane di coltura, le cellule sono state periodicamente centrifugate a 150 g per 5 minuti e il pellet è stato delicatamente passato da 3 a 5 volte attraverso una punta di pipetta di Gilson da 200 µl in un piccolo volume di terreno; quindi è stato aggiunto il volume medio finale e sono state sostituite le celle. Grappoli di cellule proliferanti sono diventati evidenti dopo un periodo di tempo variabile, che va da 5 a 7 giorni a 3 settimane. La contaminazione batterica di solito si sviluppa in circa il 20% dei campioni entro 3-4 giorni dalla coltura. Le colture in cui non sono stati rilevati cluster proliferanti dopo 4 settimane sono state scartate. Normalmente la divisione della coltura (1: 2) era solitamente necessaria dopo 3-6 settimane dall'isolamento. Gli sferoidi sono stati quindi metabolizzati ogni settimana per dissociazione meccanica o per incubazione per 3-5 minuti a 37 ° C con TrypLE Express (Thermo Fisher). Le colture venivano utilizzate per preparare gli stock congelati attorno al quinto passaggio e utilizzate per esperimenti in vitro e in vivo all'interno del dodicesimo passaggio.

Inoculo di cellule tumorali umane in modelli murini

Per ogni esperimento sono stati utilizzati topi NOD (immunocompromessi) di sesso femminile, di 4-6 settimane. Per la

convalida delle CST, sono state inoculate 5×10^5 cellule per via sottocutanea, sul fianco di 3 topi replicati, in 100 μ l PBS / Matrigel 1:1. In tutti le CST erano convalidate, gli xenotrapianti erano rilevabili entro 3-5 settimane in almeno 2 topi su 3. Gli xenotrapianti palpabili sono stati asportati, fissati in formalina e inclusi in paraffina. Le sezioni colorate con ematossilina-eosina sono state confrontate (da un patologo) rispetto al tumore umano. I tumori sono stati misurati due volte alla settimana da un calibro digitale esterno e i volumi sono stati calcolati utilizzando la seguente formula: $\pi / 6 \times d^2 \times D$, dove d e D rappresentano misurazioni del tumore più corte e più lunghe, rispettivamente. I trattamenti farmacologici sono stati avviati dopo lo stabilimento del tumore (100-150 mm³). Per gli esperimenti di trapianto secondario, i tumori (sei tumori per gruppo di trattamento) sono stati raccolti e dissociati in singole cellule. Per ogni singolo tumore, le cellule sono state iniettate in topi secondari a dosi seriali che vanno da 10 a 10³. I topi sono stati registrati come negativi quando nessun innesto è stato osservato dopo 24 settimane dall'inoculazione.

Citometria a flusso

Singole cellule dissociate da sfere (o xenotrapianti) sono state lavate con PBS/albumina di siero bovino (BSA) 1% ed incubate con la

diluizione appropriata di controllo (o anticorpo specifico) nello stesso tampone per 45 minuti a 4 ° C. L'intensità della fluorescenza delle cellule marcate è stata valutata da uno strumento FACSCanto (BD). Gli anticorpi e i controlli usati per l'analisi di routine e gli esperimenti riportati nello studio erano i seguenti: anti-EpCAM-APC, anti-EpCAM-PE e controlli isotipici di topo IgG2b-APC, mouse IgG1-APC (tutti da BD); topo IgG1-PE, anti-Lgr5-PE e anti-CD133-PE ed anti CD44v6-APC. E' sempre stata aggiunta 7-aminoactinomicina D (10 µg / ml; BD) per escludere le cellule morte [6, 7, 8].

Successivamente, ulteriori tecniche sono state utilizzate per convalidare l'ipotesi: saggio di clonogenicità, RPPA (Reverse-Phase Protein Array Analysis), Western Blotting, Viability Assay and Drug Screening, analisi dell'estrazione del DNA e delle brevi ripetizioni in tandem ed analisi statistica.

RISULTATI

La nostra casistica è composta da 22 pazienti affetti da cancro coloretale: 14 maschi (63,63%) e 8 femmine (36,36%), con un'età media di 69,77 anni (range 54 -84); di questi, 2 (9,09%) erano affetti da neoplasia del retto, 3 (13,63%) della giunzione retto-sigma, 5 (22,72%) del sigma, 1 (4,54%) del colon discendente, 5 (22,72%) del colon trasverso, 2 (9,09%) del colon ascendente e 4 (18,18%) del cieco (Fig. 4). Tutti i pazienti sono stati operati dalla stessa equipe chirurgica del Dipartimento di Scienze Chirurgiche di Roma (Policlinico Umberto I) nel periodo compreso tra il 2014 ed il 2017.

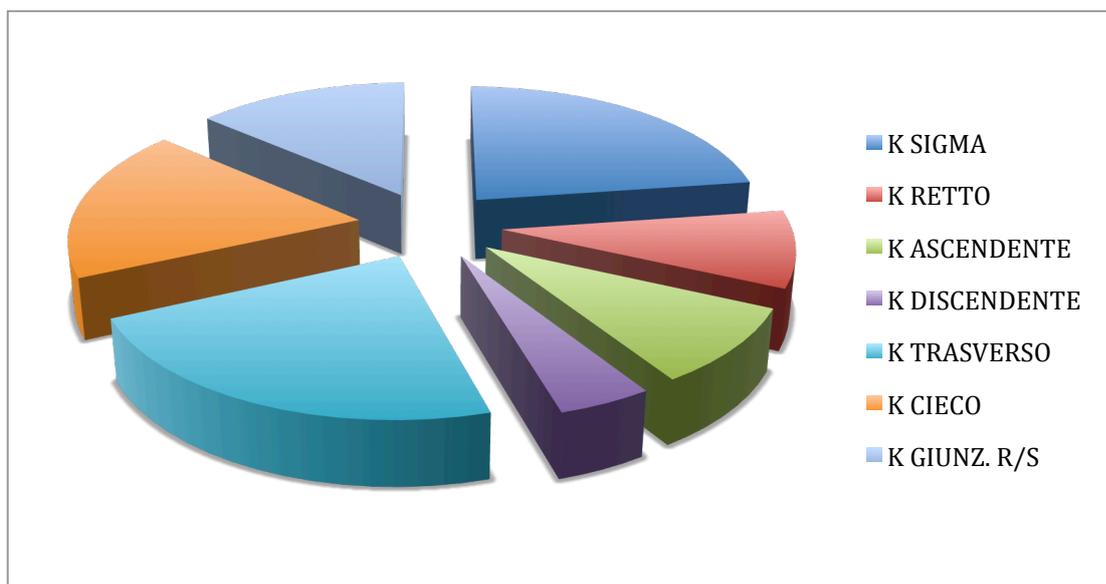


Fig. 4 - Localizzazione cancro colon

Per ogni paziente sono stati considerati i seguenti dati: anagrafica, sesso, sede della neoformazione, diametro della neoformazione, stadiazione, controllo endoscopico, istotipo, data dell'intervento e

terapia farmacologica del paziente. Nella casistica sono stati inclusi soltanto i pazienti affetti da cancro coloretale, che non erano stati sottoposti a terapia neoadiuvante, affetti da tumori maggiori di un 1 cm di diametro, non ulcerati. Tutti i pazienti sono stati informati dei rischi ed i benefici legati alla procedura ed hanno espresso pieno consenso. I pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico: 5 a *resezione anteriore del retto* (22,72%), 5 a *colectomia segmentaria del trasverso* (22,72%), 6 ad *emicolectomia destra* (27,27%) e 6 ad *emicolectomia sinistra* (27,27%). Dei 22 pazienti presi in esame, 5 (22,72%) sono risultati positivi alla presenza delle CST (*Fig. 5*); l'adenocarcinoma è risultato come istotipo in 19 (86,36%) casi, 4 (18,18%) dei quali ad insorgenza su tubulo-villoso e 2 (9,09%) con aree di differenziazione mucinosa; in 2 (9,09%) casi si è trattato di un adenocarcinoma mucinoso ed in 1 (4,54%) caso è risultato un adenoma tubulo-villoso cancerizzato. 6 (27,27%) pazienti sono deceduti (3 dei quali con CST) e 4 (18,18%) sono stati sottoposti a chemioterapia adiuvante. Nessun paziente è risultato affetto da recidiva.

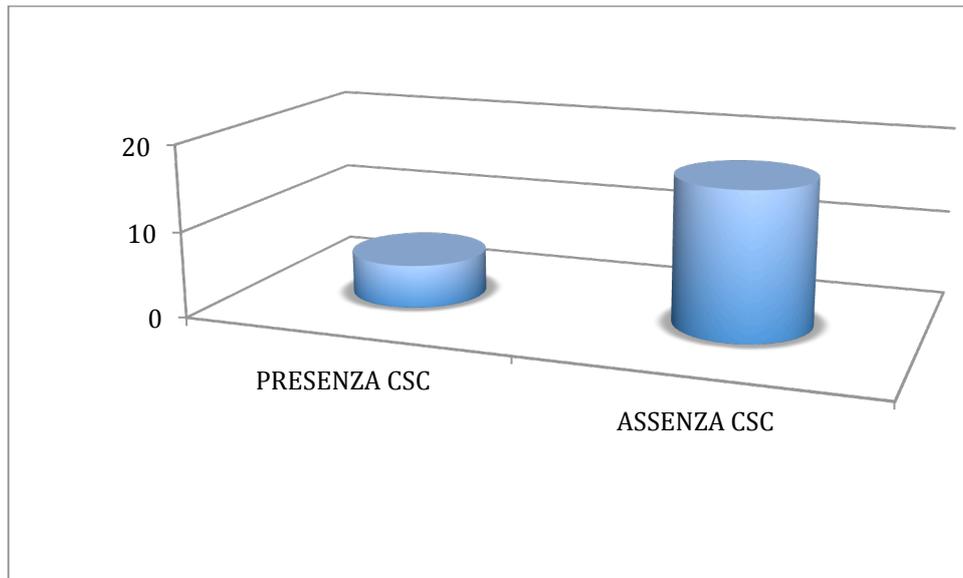


Fig. 5 - Isolamento CST

I pazienti sono tuttora monitorati e lo studio non volge ancora al termine, al fine di poter aggiungere dati fondamentali a questo tipo di ricerca (farmacoresistenza, follow-up, sopravvivenza).

DISCUSSIONE

L'ipotesi delle "Cellule Staminali Tumoralì" (CST) suggerisce l'esistenza di un'organizzazione gerarchica delle cellule che costituiscono il tumore. Secondo questa ipotesi la capacità di iniziare e sostenere la crescita del tumore, è appannaggio di una piccola percentuale di cellule, indifferenziate, con caratteristiche di staminalità, denominate cellule staminali tumorali. I risultati supportano ampiamente la validità di tale ipotesi per i carcinomi del colon. In questi ultimi il potenziale tumorigenico è confinato ad una sottopopolazione di cellule indifferenziate.

L'inoculo sottocute di una piccola frazione di cellule tumorali in topi immuno-compromessi è in grado di riprodurre fedelmente, sia da un punto di vista istologico che molecolare, il tumore parentale.

Condizioni di coltura selettive hanno permesso di espandere *in vitro* queste cellule staminali tumorali sotto forma di aggregati cellulari denominati sfere tumorali. Queste sfere mantengono un fenotipo indifferenziato. Gli studi *in vivo* su modelli murini hanno confermato il potenziale tumorigenico di queste sfere che riescono a riprodurre il tumore parentale anche dopo essere cresciute in coltura per più di un anno come cellule indifferenziate. Questi dati forniscono un'ulteriore conferma dell'elevato potenziale proliferativo e di auto-rinnovamento delle cellule isolate nei tumori del colon. Nel nostro studio i 5 pazienti affetti da CCR con presenza di CST avevano un istotipo *mucinoso* in

2 casi ed un adenocarcinoma con aree di differenziazione mucinosa in altri due casi; questo potrebbe suggerire la presenza delle CST, con probabilità maggiore, negli istotipi più aggressivi.

Sebbene le nostre conoscenze in termini di origine delle CST siano migliorate negli ultimi anni, c'è ancora molto da scoprire. Sono stati sviluppati diversi modelli a sostegno del consenso emergente che le CST derivano dall'accumulo temporale di alterazioni genetiche / epigenetiche [9, 10, 11]. Infatti, il complesso processo di trasformazione può comportare diverse fasi e può verificarsi in parallelo con un microambiente deregolato, associato a logoramento dei telomeri, inattivazione dei geni oncosoppressori e sovraregolazione degli oncogeni insieme all'instabilità genomica ed epigenetica; infatti nelle fasi più avanzate della trasformazione maligna, le CST possono eludere il sistema immunitario ed acquisire capacità metastatiche [12].

L'isolamento delle cellule staminali tumorali in questi ed altri tipi di tumori solidi, tra cui il glioblastoma [13], il melanoma [14], i carcinomi della prostata [15], mammella e pancreas [16, 17], ha profondamente influenzato la ricerca oncologica negli ultimi anni, determinando lo sviluppo di nuovi approcci finalizzati alla comprensione della biologia delle cellule tumorali staminali e conseguente sviluppo di terapie mirate alla loro eliminazione.

L'identificazione di “nicchie” (*Fig. 6*) in cui le CST risiedono in uno stato di latenza, rappresenta un valido strumento per il follow up di

pazienti che hanno ottenuto un R0 alla resezione chirurgica. E' ipotizzabile che nuovi strumenti diagnostici sviluppati specificatamente per identificare la localizzazione e lo stato di attività delle CST durante il periodo di dormienza del tumore, daranno risultati fondamentali per la precoce identificazione e gestione delle recidive e/o metastasi.

Sebbene la resezione chirurgica combinata con la terapia adiuvante sia per lo più efficace negli stadi iniziali della malattia, la recidiva e le metastasi si presentano spesso e rappresentano la più comune causa di morte nei pazienti.

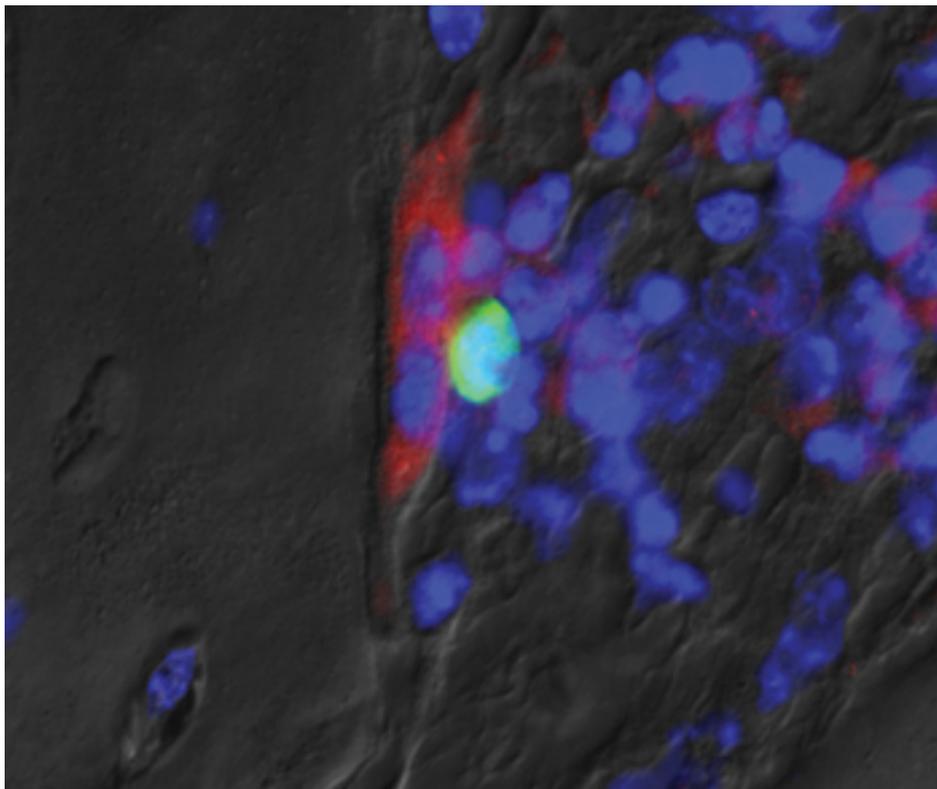


Fig. 6 - CST nicchie

(Zeuner A. The secret life of quiescent cancer stem cells. Mol Cell Oncol. 2015)

L'isolamento e la caratterizzazione delle cellule staminali tumorali (CST) da cancro del colon-retto ha definito una pietra miliare nella comprensione dei meccanismi sottostanti lo sviluppo e la progressione del cancro coloretale. Fin dalla loro scoperta, le CST coloretali sono state riconosciute come la sottopopolazione di cellule capace di sostenere l'auto-rinnovamento tumorale, la chemioresistenza e la metastatizzazione. Attualmente c'è accordo generale sul fatto che le caratteristiche molecolari delle CST sono strettamente legate al paziente e rappresentano un mezzo importante per sviluppare approcci terapeutici ad hoc. In parallelo le CST sono emerse come "biomarkers" che consentono di effettuare previsioni cliniche e di monitorare la risposta al trattamento del cancro.

Gli indizi che collegano le CST e le cellule tumorali circolanti (CTC) sono numerosi e convincenti, cominciando con l'evidenza che le cellule in grado di formare un nuovo tumore a distanza devono possedere le caratteristiche delle cellule che creano il tumore. Tuttavia, esiste ancora un divario tra le conoscenze disponibili sulle CST e le CTC ed il loro utilizzo clinico.

Uno dei tanti aspetti che necessita ulteriori approfondimenti riguarda **l'identificazione di markers aggiuntivi** che rendano sempre più efficaci e selettive le tecniche di isolamento delle cellule tumorali staminali. Tali analisi consentiranno una caratterizzazione definitiva dei marcatori di superficie che contraddistinguono le cellule staminali tumorali, ed al contempo permetteranno di comprendere quali siano le

molecole con un ruolo chiave nel processo di tumorigenesi mediato da tali cellule, con sostanziali implicazioni in campo diagnostico e terapeutico [18]. Infatti l'ostacolo maggiore è rappresentato dalla somiglianza fra le CST e le cellule staminali normali. E', quindi, molto probabile che una terapia anticancro diretta contro le staminali tumorali finisca per distruggere anche le staminali normali [19].

Un ulteriore aspetto da considerare è il **microambiente tumorale**: per poter analizzare completamente il comportamento delle CST si devono prendere in considerazione necessariamente: le nicchie delle cellule staminali, lo stroma, il sistema immunitario e la vascolarizzazione del tumore [20]. Ovviamente ci sono molti dettagli che devono ancora essere chiariti; in futuro si potrebbe pensare ai tumori come "organi", in quanto composti da più tessuti (con differente origine embrionale) [21].

Inoltre, **ogni metodo** di isolamento, espansione e coltura delle cellule CST è **associato ad una serie di inconvenienti** che comprendono: l'emergere di cambiamenti associati alla coltura, i pregiudizi genetici dovuti a pressioni selettive che agiscono durante lo xenograft , bassi tassi di successo nell'isolamento cellulare, inadeguata espansione cellulare e scarsa gestibilità delle colture per studi molecolari. Il valore finale di tali metodi dipende da molteplici fattori, tra cui la purezza cellulare, la presenza e la quantità di cellule che iniziano il tumore, la riproducibilità e la capacità delle cellule coltivate di fomentare il tumore originale nei topi [6, 22].

CONCLUSIONI

L'andamento delle curve di incidenza e mortalità dell'ultima decade testimoniano il successo della diagnosi precoce e l'efficacia delle terapie attuate nei pazienti affetti da carcinoma coloretale. Esiste pieno accordo nel riconoscere la chirurgia come unico trattamento radicale, alla quale possono essere associate la radioterapia e la chemioterapia [23].

Le CST sono le prime responsabili della progressione del tumore, della resistenza alla chemioterapia, della metastatizzazione e delle recidive.

Nei pazienti operati in maniera apparentemente radicale, il rischio di recidiva varia con lo stadio patologico del tumore primitivo. La crescente insorgenza di CCR aggressivo nei giovani adulti mette in evidenza i cambiamenti della natura di questa malattia [24].

La maggior parte dei ricercatori è ormai convinta che dipenda dalle staminali anche la ricomparsa della malattia a distanza di molto tempo dalla sua remissione. Le terapie, infatti, possono distruggere tutte le cellule tumorali, ma difficilmente riescono ad eliminare le staminali del cancro, che possono restare sopite per molto tempo, prima di riprendere il loro processo di replicazione.

La teoria delle CST può spiegare anche una recidiva tumorale dopo che un tumore è stato completamente rimosso chirurgicamente (R0 macroscopico, zero resezione residua) o dopo una risposta

apparentemente completa alla chemioterapia. E' possibile che queste cellule staminali tumorali possano annidarsi nei siti "sicuri" (nicchie) del nostro corpo, dove possono rimanere indisturbati per un lungo periodo di tempo (persino anni), finché uno stimolo non le "risvegli", causando la ripresa di malattia.

Un nuovo filone di ricerca dovrebbe focalizzarsi sulla realizzazione di strumenti diagnostici per seguire i pazienti dopo resezione chirurgica R0 o dopo una risposta completa alla terapia, per una diagnosi precoce di recidive e metastasi [25].

L'identificazione della nicchia in cui le CST risiedono in uno stato quiescente potrebbe rappresentare uno strumento valido per il follow-up dei pazienti anche dopo aver ottenuto una resezione chirurgica R0 ed il target terapeutico per prevenire le recidive [26].

L'ipotesi delle cellule staminali del cancro potrebbe parzialmente spiegare il concetto di malattia residua minima. Dopo resezioni chirurgiche macroscopicamente a residuo zero (R0), anche la persistenza di poche cellule staminali tumorali nascoste nelle "nicchie" potrebbe dar luogo a recidive a distanza [27].

I risultati mostrano che le colture sferoidali arricchite con CST acquisiscono fedelmente le caratteristiche dei tumori del colon-retto primari. Ancora più importante, le linee CST forniscono un efficiente sistema sperimentale per eseguire test preclinici dei farmaci chemioterapici ed immunoterapici, portando così ad una profonda

comprensione dei determinanti molecolari della resistenza alla terapia e della sensibilità del tumore alle terapie combinate [6, 28, 29, 30].

In particolare, sfruttando i progressi dell'immunoterapia del cancro: è, infatti, ampiamente dimostrato che il microambiente giochi un ruolo fondamentale nel supportare il tumore, quindi, la relazione tra CST e sistema immunitario ospite è oggetto di studio intensivo, con l'obiettivo di sviluppare strategie terapeutiche efficaci che mirano alla capacità delle CST di sfuggire alla sorveglianza immunitaria [31].

L'isolamento delle CST rappresenta un valido supporto alla terapia chirurgica e permette uno studio più approfondito del tumore al fine di poter somministrare una terapia personalizzata, più efficace e a lungo termine (*Fig. 7*).

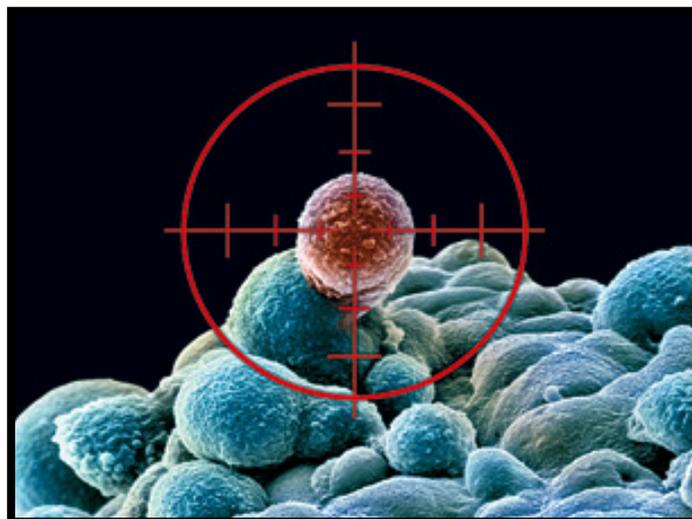


Fig. 7 – CST target

BIBLIOGRAFIA

1) Bonnet D, Dick JE. **Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell.** Nat. Med. 1997; 3:730–737

2) Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J. et al. **The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia.** Cell. 2012;150(2):264–278.

3) Manic G, De Maria R, Vitale I. **Replication stress in colorectal cancer stem cells.** Oncotarget. 2017 Oct 31; 8(53): 90606–90607

4) Vitale I, Manic G, De Maria R, Kroemer G, Galluzzi L. **DNA Damage in Stem Cells.** Mol Cell. 2017 May 4;66(3):306-319.

5) Zeuner A. **The secret life of quiescent cancer stem cells.** Mol Cell Oncol. 2015 Jan-Mar; 2(1): e968067

6) De Angelis ML, Zeuner A, Policicchio E, Russo G, Bruselles A, Signore M, Vitale S, De Luca G, Pillozzi E, Boe A, Stassi G, Ricci-Vitiani L, Amoreo CA, Pagliuca A, Francescangeli F, Tartaglia M, De Maria R, Baiocchi M. **Cancer Stem Cell-Based Models of Colorectal Cancer Reveal Molecular Determinants of Therapy Resistance** Stem Cells Transl Med. 2016 Apr; 5(4): 511–523.

7) Matthew A. Sanders and Adhip P. N. Majumdar. **Colon cancer stem cells: implications in carcinogenesis.** Front Biosci (Landmark Ed). 2011 Jan 1; 16: 1651–1662.

8) Yuichiro Hatano, Shinya Fukuda, Kenji Hisamatsu, Akihiro Hirata,

Akira Hara, and Hiroyuki Tomita. **Multifaceted Interpretation of Colon Cancer Stem Cells.** Int J Mol Sci. 2017 Jul; 18(7): 1446.

9) Mimeault M, Batra SK. **Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications.** Ageing Res Rev. 2009;8(2):94–112.

10) Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. **The epigenetic progenitor origin of human cancer.** Nat Rev Genet. 2006;7(1):21–33.

11) Tan Boon Toh,¹ Jhin Jieh Lim,¹ and Edward Kai-Hua Chow. **Epigenetics in cancer stem cells.** Mol Cancer. 2017; 16: 29.

12) Franco S.S, Hadas R.A, Kobolak J, Algahtani M, Mobasheri A, Dinnves A. **The crossroads between cancer stem cells and aging.** BMC Cancer. 2015; 15(Suppl 1): S1.

13) Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. **Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.** Cancer Res 2004; 64: 7011–7021.

14) Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. **A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas.** Cancer Res. 2005; 65:9328–9337.

15) Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L, Tang DG. **Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft**

human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 2006; 25: 1696–1708.

16) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:3983–3988.

17) Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. **Identification of pancreatic cancer stem cells.** *Cancer Res.* 2007; 67: 1030-1037.

18) Won-Tae Kim and Chun Jeih Ryu. **Cancer stem cell surface markers on normal stem cells.** *BMB Rep.* 2017 Jun; 50(6): 285–298.

19) Zhao Jihe. **Cancer Stem Cells and Chemoresistance: The Smartest Survives the Raid.** *Pharmacol Ther.* 2016 Apr; 160: 145–158.

20) Wenqi Shanguan, Chuanwen Fan, Xiolong Chen, Ran Lu, Yuan Liu, Yu Li, Yanna Shang, Dongqin Yin, Shengliang Zhang, Qiaorong Huang, Xue Li, Wentong Meng, Hong Xu, Zongguang Zhou, Jiankun Hu, and Xianming Mo. **Endothelium originated from colorectal cancer stem cells constitute cancer blood vessels.** *Cancer Sci.* 2017 Jul; 108(7): 1357–1367.

21) Sugong Chen and Emina H. Huang. **The Colon Cancer Stem Cell Microenvironment Holds Keys to Future Cancer Therapy.** *J Gastrointest Surg.* 2014 May; 18(5): 1040–1048.

22) Sneha Balani,¹ Long V. Nguyen,¹ and Connie J. Eaves. **Modeling the process of human tumorigenesis.** *Nat Commun.* 2017; 8: 15422.

- 23) Candioli S, Manigrasso A, Arcieri S, Filippini A. **Extraperitoneal rectal cancer surgery** G Chir. 2008 Aug-Sep;29(8-9):326-34.
- 24) Colace L, Boccia S, De Maria R, Zeuner A. **Colorectal cancer: towards new challenges and concepts of preventive healthcare.** Ecancermedicalsecience. 2017; 11: ed74.
- 25) D'Andrea V, Panarese A, Tonda M, Biffoni M, Monti M. **Cancer stem cells as functional biomarkers.** Cancer Biomark. 2017 Sep 7;20(3):231-234.
- 26) Zeuner A, Todaro M, Stassi G, De Maria R. **Colorectal Cancer Stem Cells, from the crypt to the clinic.** Cell Stem Cell, 4 Dec. 2014;15(6):692-705.
- 27) D'Andrea V, Guarino S, Di Matteo F.M, Maugeri Saccà M, De Maria R. **Cancer stem cells in surgery** G Chir. 2014 Nov-Dec; 35(11-12): 257–259.
- 28) Cheng-Liang Zhang, Ting Huang, Bi-Li Wu, Wen-Xi He, and Dong Liu. **Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges.** Oncotarget. 2017 Sep 26; 8(43): 75756–75766.
- 29) Kiyoungh Eun, Seok Won Ham, and Hyunggee Kim. **Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting.** BMB Rep. 2017 Mar; 50(3): 117–125.
- 30) Magdalena Szaryńska, Agata Olejniczak, Jarosław Kobiela, Piotr Spychalski, and Zbigniew Kmiec. **Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer.** Oncol Lett. 2017 Dec; 14(6): 7653–7668.

31) Fiori M, Villanova L, De Maria R. **Cancer stem cells: at the forefront of personalized medicine and immunotherapy.** Curr Opin Pharmacol. 2017 Aug;35:1-11.