



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
BIOMEDICHE**

*Coordinatore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana*

**INDIRIZZO IN EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI**

*Responsabile di Indirizzo: Prof. ssa Rosa Maria Pascale*

**XXVIII CICLO**

Marcatori Molecolari di Cellule Staminali nella cancerogenesi epatica  
sperimentale.

**Direttore:**

Prof. Andrea Fausto Piana

**Tutor:**

Prof.ssa Maria Maddalena Simile

**Tesi di dottorato:**

Dott.ssa Marta Mela

**Anno Accademico 2014/2015**

# INDICE

## SEZIONE COMPILATIVA

<b>1.INTRODUZIONE:</b>	Pag 4
1.1 Cellule Staminali:caratteristiche generali.	Pag 5
1.2 Cellule Staminali Adulte.	Pag 8
1.3 Cellule Staminali e Potenziali Utilizzi Clinici nella medicina rigenerativa.	Pag 10
1.4 Cellule Staminali e rigenerazione epatica.	Pag 13
1.5 Cellule Progenitrici Epatiche (LPCs-Liver Progenitors Cells) e risposta duttulare.	Pag 17
<b>2.CELLULE STAMINALI E CICLO CELLULARE</b>	Pag 21
<b>3.CELLULE STAMINALI TUMORALI</b>	Pag 23
3.1 Marcatori molecolari associati al fenotipo della cellula staminale.	Pag 29
<b>4.IL CARCINOMA EPATOCELLULARE</b>	Pag 31
4.1 Teoria della nascita dell'HCC dalle CSCs.	Pag 37
<b>SEZIONE SPERIMENTALE</b>	
<b>5.SCOPO DELLA RICERCA</b>	Pag 40
<b>6.MATERIALI E METODI</b>	
6.1 Animali e trattamenti.	Pag 41
6.2 Marcatori tumorali.	Pag 43
6.3 Colorazione Immunoistochimica.	Pag 45
6.4 Western Blot.	Pag 47
6.5 Analisi Statistica.	Pag 49

## **7.RISULTATI**

7.1 Risultati immunoistochimica.

Pag 50

7.2 Risultati Western Blot.

Pag 60

## **8 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Pag 62

## **9.BIBLIOGRAFIA**

Pag 64

# 1. INTRODUZIONE

Il compartimento staminale, ormai identificato in tutti i tessuti, è caratterizzato da una sottopopolazione di cellule dotate della prerogativa esclusiva di autorinnovamento e di persistenza per tutta la vita dell'individuo (1). Una teoria, oggi sostenuta da un numero sempre crescente di prove sperimentali, suggerisce che tali cellule destinate a dividersi periodicamente per tutta la vita di un individuo, possano diventare un facile bersaglio per la trasformazione tumorale. Molti studi negli ultimi anni hanno dimostrato, infatti, che alcune forme di tumore sono caratterizzate dalla presenza di cellule con specifiche proprietà *stem-like*, dette anche cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells/CSCs*). Le CSC possiedono le stesse peculiari capacità delle cellule staminali normali di auto-rinnovarsi, la potenzialità di dare origine a una o più specie cellulari all'interno del tumore e, una volta differenziate in cellule neoplastiche, l'abilità di proliferare in modo continuo. Da queste evidenze si è giunti alla formulazione della *Cancer stem Cell Hypothesis*, secondo la quale a sostenere la crescita del tumore e a causare recidive, sarebbe una ristretta popolazione cellulare di cellule staminali tumorali (2).

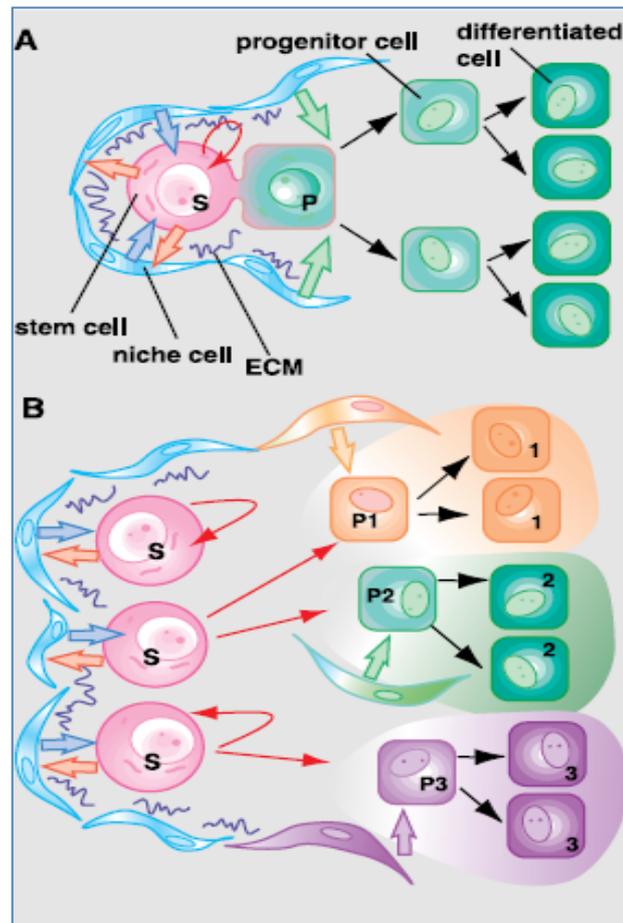
## 1.1 Cellule Staminali: caratteristiche generali.

Le cellule staminali (CS) si definiscono come precursori cellulari immaturi dotati di auto rinnovamento (self-renewal) in grado cioè di replicarsi per periodi indefiniti mantenendo lo stato indifferenziato e della grande potenzialità di differenziazione multilineare (3).

Le cellule staminali presentano due diversi meccanismi di divisione cellulare:

- *Replicazione simmetrica*: la cellula staminale origina due cellule figlie di cui una conserva le caratteristiche di staminalità mentre l'altra, chiamata progenitore cellulare, va incontro a differenziamento.
- *Replicazione asimmetrica*: la cellula staminali da origine a due cellule figlie identiche che possono essere due cellule staminali oppure due cellule progenitrici.

Attraverso la divisione cellulare asimmetrica definita “mitosi bivalente”, la cellula staminale da origine a due cellule figlie, di cui una identica a se stessa, scarsamente proliferante ed in grado di mantenere invariato il pool di cellule staminali di quel tessuto, l'altra con capacità proliferativa e di maturazione progressiva verso un fenotipo e con funzioni ben specifiche (4) (Fig.1).



**Fig.1. Modelli alternativi di divisione asimmetrica per la distribuzione di cellule staminali.**

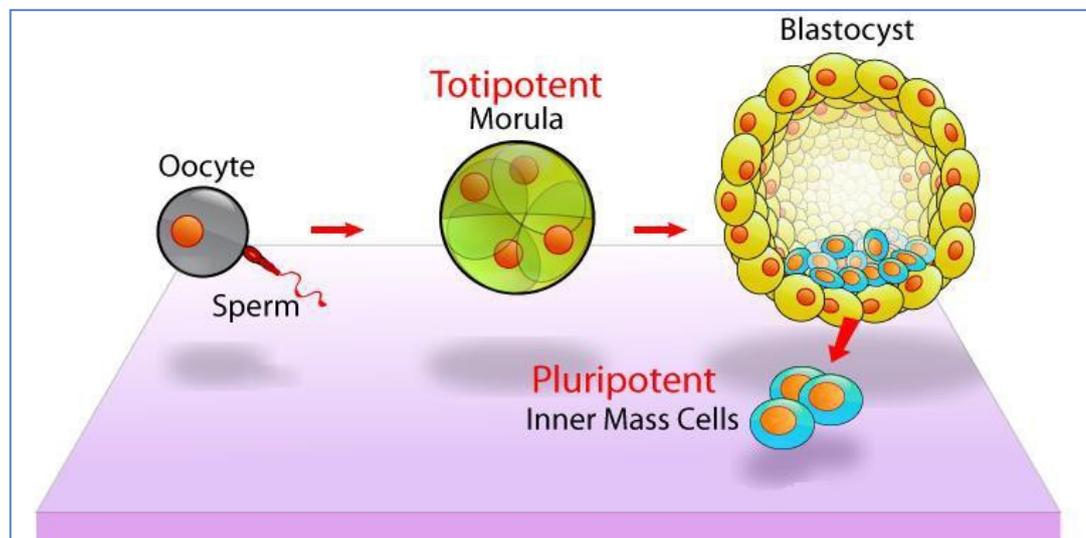
(A) una cellula staminale (S) dà origine dalla divisione asimmetrica ad una cellula progenitrice (P) con una proliferazione più ristretta che differenzia in risposta a segnali estrinseci. Il fenotipo delle cellule staminali è regolato dalla proprietà dell'automantenimento (frecche spesse colorate); (B) Le cellule staminali danno origine a cellule figlie che possono essere sia cellule staminali che progenitrici le quali possono differenziarsi seguendo diversi percorsi (1,2 e 3) a seconda della combinazione di fattori estrinseci a cui sono esposti. (Watt et al. 2000).

Attualmente vi è un enorme interesse per un possibile impiego terapeutico delle cellule staminali nella cura di un vasto spettro di patologie, sulla base della elevata potenzialità differenziativa delle cellule staminali (5), isolate da adulto, cordone ombelicale, da feti, da gonadi fetali (cellule embrionali germinali) e

dall'embrione reimpiantato (cellule staminali embrionali). In base alle loro potenzialità differenziative, le cellule staminali sono divise in:

- **Totipotente**, in grado cioè di dare origine a tutti i tessuti embrionali ed extraembrionali, l'unica cellula in grado di fare ciò è lo **zigote**, originato dalla fusione del gamete maschile con il gamete femminile.
- **Pluripotenti**, in grado di differenziare in cellule appartenenti a tutti i tessuti dell'organismo; tali cellule si distinguono in *cellule staminali embrionali (ESCs, Embryonic Stem Cells)*, che vengono isolate dalla massa cellulare interna della blastocisti (**IMC, Inner Mass Cell**) prima dell'impianto in utero (Fig.2) (6-9), ed in *cellule staminali del cordone ombelicale* in grado di dare origine a diversi tipi cellulari e le cui capacità differenziative possono essere paragonate a quelle delle cellule staminali ematopoietiche (10).
- **Multipotenti**, capaci di dare origine ad un numero limitato di cellule differenziate, le cellule staminali presenti negli organi, quindi in tessuti adulti, che garantiscono all'organo un elevato potenziale rigenerativo anche in seguito ad un danno.

- **Unipotenti**, sono presenti in alcuni tessuti adulti sottoposti a continuo rinnovamento, quali ad esempio gli epitelii, possiedono capacità di dare origine ad un solo tipo cellulare appartenente al tessuto di residenza (6).



**Fig.2. Rappresentazione schematica della formazione di cellule staminali embrionali.**

Le cellule staminali embrionali derivano dalla inner cell mass della blastocisti in seguito a distruzione del trofoblasto (Teo A et al 2010).

## 1.2 Cellule Staminali Adulte.

Sono cellule indifferenziate localizzate nei tessuti di un organismo adulto con capacità di autorinnovamento anche se in una forma più limitata rispetto alle cellule staminali embrionali e rispetto ad esse hanno anche una capacità differenziativa ristretta infatti sono cellule unipotenti o multi potenti. Il ruolo primario di queste cellule è il mantenimento e la riparazione del tessuto in cui

sono localizzate (12). Le cellule staminali adulte sono note fin dagli anni sessanta quando si scoprì la presenza di due diversi tipi di cellule staminali all'interno del midollo osseo:

- *cellule staminali ematopoietiche* (Hematopoietic Stem Cells, HSC) che danno origine ai vari tipi di cellule del sangue;
- *cellule staminali mesenchimali* (Mesenchymal Stem Cells o MSCs) o cellule stromali del midollo osseo che danno origine a osteociti, condrociti, adipociti e altre cellule del tessuto connettivo

Le cellule staminali adulte sono state trovate in quasi tutti gli organi: cervello, midollo osseo, vasi sanguigni, scheletro, muscoli, pelle e fegato ma il numero di queste cellule è molto basso (12,13). All'interno di questi organi le cellule staminali risiedono in particolari micro-ambienti chiamati **nicchie** dove rimangono allo stato quiescente per molto tempo e quando vengono attivate in caso di malattia o danno iniziano a proliferare, migrano fuori dalla nicchia e vanno incontro al differenziamento (14). Queste nicchie protettive contengono anche diversi tipi di cellule specializzate che secernono particolari fattori e organizzano la matrice extra-cellulare in modo tale da permettere alle cellule staminali stesse di mantenere la capacità di autorinnovamento o di andare incontro ad un eventuale differenziamento. Queste caratteristiche peculiari delle

cellule staminali adulte fanno sì che esse possano differenziare in tipi cellulari di derivazione embriologica diversa. Questa capacità, chiamata **plasticità**, consente ad esempio ad una cellula staminale impiantata in tessuti già differenziati, di dar luogo a tipi cellulari non presenti nel tessuto di origine ed è strettamente dipendente dalle influenze del microambiente in cui la cellula staminale si trova a crescere (14-16). Così, ad esempio, una staminale del midollo osseo può dare origine ad una cellula epatica, cardiaca o nervosa (17).

### **1.3 Cellule Staminali e Potenziali Utilizzi Clinici nella medicina rigenerativa.**

Per la medicina rigenerativa del futuro sarà importante lo sviluppo di strategie tese all'ottenimento di grandi quantità di cellule staminali da impiegarsi nella pratica clinica. Difficoltà di tipo tecnico per le cellule staminali somatiche e di tipo tecnico ed etico per quelle embrionali, costituiscono però dei limiti a un impiego terapeutico delle cellule staminali (18,19). I possibili utilizzi delle cellule staminali sono molteplici e la ricerca in questo campo è molto intensa. I principali campi di applicazione sono:

#### **➤ *Test farmacologici***

Le cellule staminali possono essere utilizzate come target nello studio di nuovi farmaci, al fine di valutare la tossicità di diversi farmaci insieme dopo aver indotto in vitro la differenziazione delle cellule staminali nei tipi cellulari d'interesse. Uno dei problemi principali, riguardo all'utilizzo delle cellule staminali in questo campo, è che le tecniche di differenziamento delle cellule staminali non sono ancora completamente efficienti e persiste la difficoltà di generare popolazioni pure (19,20).

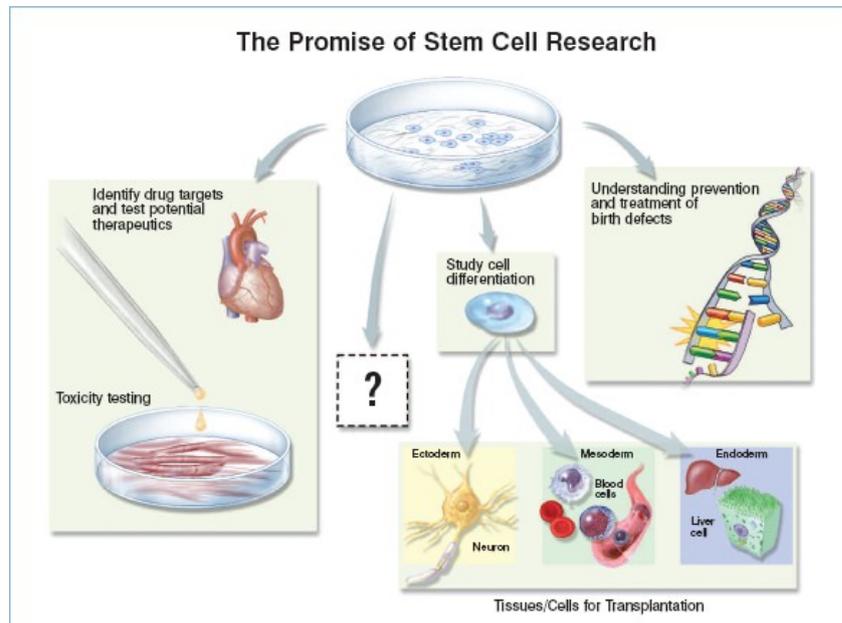
➤ ***Patologie causate da divisioni cellulari anormali.***

Alcune delle patologie più gravi come il cancro sono provocate da divisioni cellulari o differenziamento cellulare anormali. Per cercare un rimedio a questo tipo di difetti è necessario essere a conoscenza dei meccanismi responsabili di questi processi. In questo senso le cellule staminali offrono l'opportunità di studiare le diverse vie molecolari coinvolte in questi processi, permettendo di sviluppare nuove terapie mirate (20,21).

➤ ***Terapia cellulare***

La più importante prospettiva applicativa riguardante le staminali è costituita dalla generazione di cellule e tessuti da utilizzare nella terapia cellulare. Attualmente, alla presenza di un organo non funzionale o irreversibilmente

danneggiato, l'unica possibilità di guarigione è rappresentata dal trapianto di organi, che presenta però diversi limiti quali la disponibilità di organi, la compatibilità tra paziente e donatore e il rischio di rigetto (22). Le cellule staminali possono essere indotte a differenziare in cellule e tessuti che possano sostituire quelli danneggiati, oppure possono essere impiegate nella cura delle malattie degenerative, in cui si ha una continua e progressiva perdita di cellule endogene con una mancata o insufficiente sostituzione ad opera del tessuto malato (23, 24). Tra le principali patologie che potrebbero essere curate con le cellule staminali sono comprese diverse malattie croniche, tra cui il Parkinson, la sclerosi multipla, i danni alla colonna vertebrale per fragilità ossea, alcune malattie cardiache epatiche e il diabete (25,26) (Fig.3).



**Fig.3. Possibili applicazioni delle cellule staminali nella ricerca scientifica.**

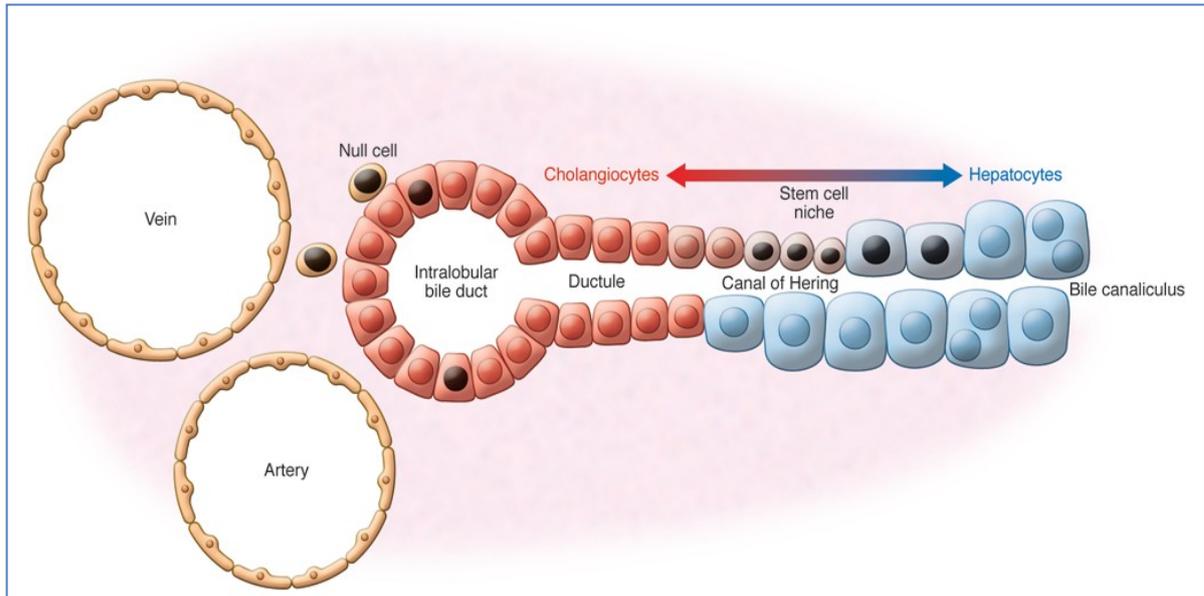
Le cellule staminali potranno essere utilizzate nella ricerca di base sulla differenziazione e la funzione dei tessuti umani. Dalla coltura delle cellule staminali si potranno eseguire test di tossicità, sicurezza ed efficacia dei farmaci; studiare la differenziazione delle cellule staminali in vitro per trapianti di organi e tessuti ed inoltre gli esperimenti su cellule staminali potrebbero fornire informazioni sui difetti genetici prima della nascita. (<http://stemcells.nih.gov/info/>).

#### 1.4 Cellule Staminali e rigenerazione epatica.

La rigenerazione epatica, processo fisiologico indispensabile per la normale omeostasi del fegato, è l'evento finale di un complesso processo che implica l'interazione di diversi tipi cellulari e segnali molecolari che compongono il microambiente del fegato. La capacità rigenerativa del fegato viene assicurata dalla replicazione di epatociti sani; attivazione, espansione e differenziamento del compartimento di cellule staminali, o da una combinazione di entrambe i

processi (27,28). Ciò dipende dalla natura del danno che il fegato ha subito e dalla sua intensità e durata. Il fegato ha un ruolo centrale nell'omeostasi metabolica essendo responsabile del metabolismo, della sintesi, dell'immagazzinamento e della distribuzione dei nutrienti; inoltre, produce una considerevole quantità di proteine sieriche come l'albumina, le proteine di fase acuta, i fattori della coagulazione, enzimi e cofattori. Da non dimenticare infine, che il fegato è a tutti gli effetti il principale organo ad azione detossificante, in grado di rimuovere le scorie e gli xenobiotici attraverso processi metabolici e di coniugazione biliare. Le principali cellule coinvolte nel processo di rigenerazione sono gli epatociti che si dispongono a formare la principale unità funzionale del fegato, il lobulo epatico (27-29). Il turn-over cellulare degli epatociti è relativamente lento, la vita media di un epatocita si aggira, infatti, intorno ai 200-300 giorni e per tale motivo il fegato, secondo il Bizzozzero, è costituito da un tessuto stabile. Pertanto in caso di danno epatico, gli epatociti escono dalla fase G<sub>0</sub> del ciclo cellulare ed iniziano a replicare al fine di rigenerare la massa persa (30). A conferma di ciò, dopo epatectomia parziale, avviene la proliferazione dei compartimenti principali epiteliali (epatociti e colangiociti), seguita dalla proliferazione delle cellule mesenchimali (cellule stellate), che ripristina velocemente la massa epatica (31). Nell'uomo, però,

numerose condizioni patologiche sono tali da compromettere le capacità rigenerative degli stessi epatociti, pertanto in caso di lesione epatica conseguenti ad epatopatia cronica, epatite fulminante, epatite virale o steatosi epatica grave viene attivato un compartimento di cellule staminali, che prendono il nome di “cellule progenitrici epatiche” nell’uomo o “cellule ovali” nel modello murino (32). Tali cellule risiedono nei Canali di Hering che rappresenta la più piccola e periferica diramazione dell’albero biliare, che mette in comunicazione i canalicoli biliari localizzati tra le superfici cellulari di due epatociti adiacenti con i dotti biliari interlobulari (32, 33). I canali di Hering rappresentano il collegamento anatomico e fisiologico tra gli epatociti ed il sistema biliare comprendente i colangiociti (34, 35) (Fig.4).



**Fig.4. Modello della nicchia di cellule staminali o progenitrici epatiche nel canale di Hering.** Le cellule staminali epatiche o progenitrici epatiche (nuclei neri) si trovano nel canale di Hering e sono il collegamento anatomico e fisiologico tra i canalicoli biliari, dove hanno sede gli Epatociti, e i dotti biliari nei quali risiedono i Colangiociti. Le cellule progenitrici epatiche possono differenziare sia in Epatociti che in Colangiociti a seconda dello stimolo differenziativo che ricevono (Claus Kordes, 2013).

Nel 1956 Farber individuò, con colorazione istologica ematossilina-eosina, nel fegato di ratto cellule di piccole dimensioni con scarso citoplasma lievemente basofilo e il nucleo con una pallida colorazione blu che chiamò *cellule ovali*. Nei roditori le cellule ovali possono essere attivate utilizzando diverse strategie che, inibiscono la replicazione degli epatociti residenti, generando uno stimolo rigenerativo come risposta al danno (36). Tale risposta rigenerativa non è sufficiente in presenza di malattie croniche in fase terminale e in casi di

insufficienza epatica acuta, quando l'unica opzione terapeutica è rappresentata dal trapianto di fegato (37,38).

All'analisi istologica le cellule progenitrici epatiche sono difficili da identificare esclusivamente in base alla loro morfologia, mentre sono individuabili utilizzando specifici marcatori immunostochimici tipici di epatociti e colangiociti maturi. Le cellule progenitrici epatiche risultano positive alla marcatura con citocheratine (CK), in particolare CK7 e CK19, albumina e CK8 tipici degli epatociti maturi; alfa-fetoproteina tipica degli epatoblasti e CD133 e c-kit tipici marcatori delle cellule staminali ematopoietiche. L'esistenza di cellule staminali nel fegato era già stata postulata da Wilson & Leduc, nel 1958. Loro hanno ipotizzarono che le cellule dei colangioli distali dei dotti biliari (canali di Hering) fossero responsabili del ripristino della massa epatica in roditori sottoposti ad una particolare dieta (39).

### **1.5 Cellule Progenitrici Epatiche (LPCs-Liver Progenitors Cells) e risposta duttulare.**

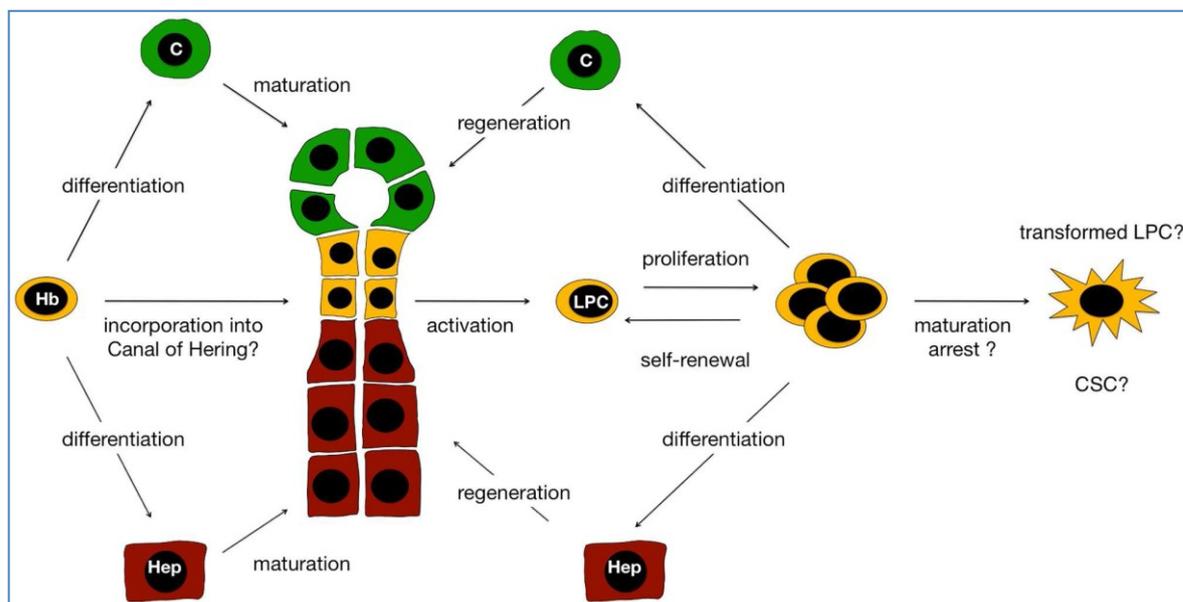
Un danno epatico tale da compromettere le capacità rigenerative degli epatociti, attiva il compartimento di cellule staminali disposto a livello dei Canali di

Hering, fisiologicamente presenti in stato quiescente (40,41). Questa risposta, chiamata in generale “**risposta delle cellule ovali**” nei roditori e “**reazione duttulare**” nell’uomo, si esprime sia in un aumento della popolazione biliare che nella differenziazione epatocitaria. E’ importante sottolineare che la reazione duttulare non è sempre la stessa in ogni patologia epatica, ma è quantitativamente differente in relazione al tipo e all’entità del processo patologico (42). Anche dal punto di vista molecolare ci sono attivazioni di vie di trasduzione differenti: i sistemi di WNT e Notch sono implicati, il primo nel mantenere le cellule in uno stato proliferativo piuttosto che differenziativo, mentre il secondo nell’indirizzare il differenziamento. La risposta delle cellule ovali si può dividere in 4 fasi: *attivazione, proliferazione, migrazione e differenziamento*. Molteplici tipi cellulari sono presenti durante l’attivazione delle cellule progenitrici epatiche tra cui cellule epiteliali, ematopoietiche e mesenchimali. I segnali molecolari che fanno partire la cascata di attivazione delle cellule progenitrici possono agire sia direttamente sulla loro proliferazione, che indirettamente tramite la stimolazione di cellule non endoteliali le quali a loro volta inviano segnali molecolari alle cellule progenitrici epatiche bersaglio (42,43). In seguito all’attivazione, le LPC proliferano nella regione periportale e con la progressione del danno epatico migrano infiltrandosi nel parenchima

lungo i canalicoli biliari. Le LPC fanno parte di una popolazione cellulare eterogenea ed immatura che mostrano un fenotipo intermedio prima che differenzino in una linea cellulare precisa. È importante sottolineare che, dall'attivazione al differenziamento o alla trasformazione, queste cellule cambiano continuamente la loro morfologia, il fenotipo e, di conseguenza, i marcatori di espressione. Le LPC esprimono diverse combinazioni di marcatori fenotipici sia dalla stirpe epatocitica che biliare (colangiocitica) e condividono anche epitopi con le cellule ematopoietiche e le cellule staminali del cancro (CSC) (43). Esse hanno dimostrato di differenziarsi sia in cellule della linea epatocitica che colangitica, quindi non è sorprendente che non sia stato individuato un solo marcatore LPC-specifico ma che sia richiesta una combinazione di marcatori fenotipici per l'identificazione o l'isolamento di tali cellule (44), questo fatto rende difficoltosa l'individuazione e la caratterizzazione di tali cellule. L'attivazione, la proliferazione, la migrazione e il differenziamento delle LPC sono controllati da citochine, le stesse cellule progenitrici epatiche, infatti, producono una gamma di citochine, tra cui linfotossina (LT) che agisce da recettore chemiotattico per altre cellule pro-infiammatorie coinvolte nella risposta per la riparazione delle ferite attivate dalla presenza di un danno epatico cronico. Sono stati identificati anche altri fattori

paracrini che mediano la risposta delle cellule progenitrici, compreso il fattore di necrosi tumorale (TNF), interferone gamma (IFN), e fattore di crescita trasformante beta (TGF $\beta$ ) (45,46). Le cellule progenitrici epatiche hanno diverse potenzialità proliferative, comportandosi come vere e proprie cellule staminali unipotenti; anche nel corso di numerose patologie epatiche, la capacità proliferativa delle cellule parenchimali mature è in grado di garantire la *restitutio ad integrum* dell'organo. In numerose patologie umane viene attivato il compartimento staminale residente, ad esempio, nell'epatite acuta, dove l'entità e la rapidità con cui si instaura il danno è tale che i soli epatociti non sono sufficienti a far fronte alla perdita parenchimale. Inoltre, anche in patologie croniche di lunga data, dove viene meno la capacità proliferativa delle cellule parenchimali e viene attivato il compartimento staminale (47). Qualora le LPCs rimangano in uno stato di attiva proliferazione, anche in seguito a riparazione del danno, possono acquisire mutazioni stabili e gravi a livello genico. Se le mutazioni non vengono riparate e le cellule continuano comunque a sopravvivere, potrebbero acquisire un fenotipo maligno e diventare Cellule Staminali del Cancro (48) (Fig.5). Alcune importanti evidenze sperimentali sembrano, infatti, confermare il coinvolgimento delle cellule ovali nel processo di trasformazione neoplastica durante l'epatocancerogenesi. Attualmente non

sono ancora noti i meccanismi cellulari e molecolari con cui queste cellule partecipano al processo di trasformazione neoplastica, né se esista una interazione con altre cellule tipiche del tessuto epatico (es. cellule stellate, fibroblasti, epatociti, ecc)(48-51).



**Fig.5. Genesi delle Cellule Progenitrici Epatiche (LPCs).**

Durante lo sviluppo del fegato gli Epatoblasti (Hb) possono differenziarsi in Colangiociti (C) ed Epatociti (Hep) che vengono incorporati nel Canale di Hering, nel quale risiedono come compartimento di cellule staminali (LPC). In seguito ad un insulto le LPC vengono attivate e acquisiscono capacità di auto rinnovamento e di proliferazione, si ipotizza che differenziandosi verso la linea cellulare epatocitaria o colangitica per rigenerare il parenchima epatico. Le LPC che mantengono lo stato di proliferazione possano trasformarsi in cellule staminali tumorali (CSC). (Janina E.E. et al 2012.).

## 2.CELLULE STAMINALI (CS) E CICLO CELLULARE

La comprensione dei fattori che controllano la crescita delle CS e la loro capacità differenziativa potrà sicuramente far luce su quelli che sono i

meccanismi di un'eventuale trasformazione neoplastica delle stesse e quindi suggerire nuovi approcci terapeutici. La capacità espansiva delle CS è sotto il controllo di costrizioni genetiche, necessarie ad impedire un'espansione illimitata di questo compartimento (52). Tale espansione, associata all'abilità delle cellule staminali di entrare in circolo, si tradurrebbe, infatti, nella creazione di un fenotipo cellulare con caratteristiche biologiche analoghe a quelle di una *cellula neoplastica* (53). In genere, la percentuale di CS *in vivo proliferanti* è nettamente inferiore a quella delle cellule differenziate. Non sono ancora del tutto noti quali siano i segnali, extra- ed intracellulari che stabilisca quale CS debba rimanere quiescente, quale e quando debba entrare nel ciclo cellulare, o venga indirizzata verso una linea differenziativa (53,54). Le attuali conoscenze della biologia delle cellule staminali si devono principalmente agli studi di ematologia ed oncoematologia sia per la facilità di accesso al sangue periferico e al midollo sia per tutti gli studi che sono stati condotti nei trapianti in ambito ematologico. Tra i geni che controllano i segnali necessari per stabilire quale cellula debba rimanere una CS e quale iniziare il processo di differenziamento sono stati individuati geni quali Oct-4, Wnt/b-catenina, Notch, chinasi della famiglia Janus (55). La perdita, le mutazioni, le attivazioni e alterati funzionamenti di tali sistemi, necessari per una normale organogenesi, sono stati

strettamente correlati allo sviluppo e progressione di diversi tumori. Pertanto l'esistenza di similitudini tra i meccanismi molecolari che controllano la proliferazione e il differenziamento delle CS e dei tumori, può rappresentare una prova indiretta della presenza di una relazione tra CS e tumori (56).

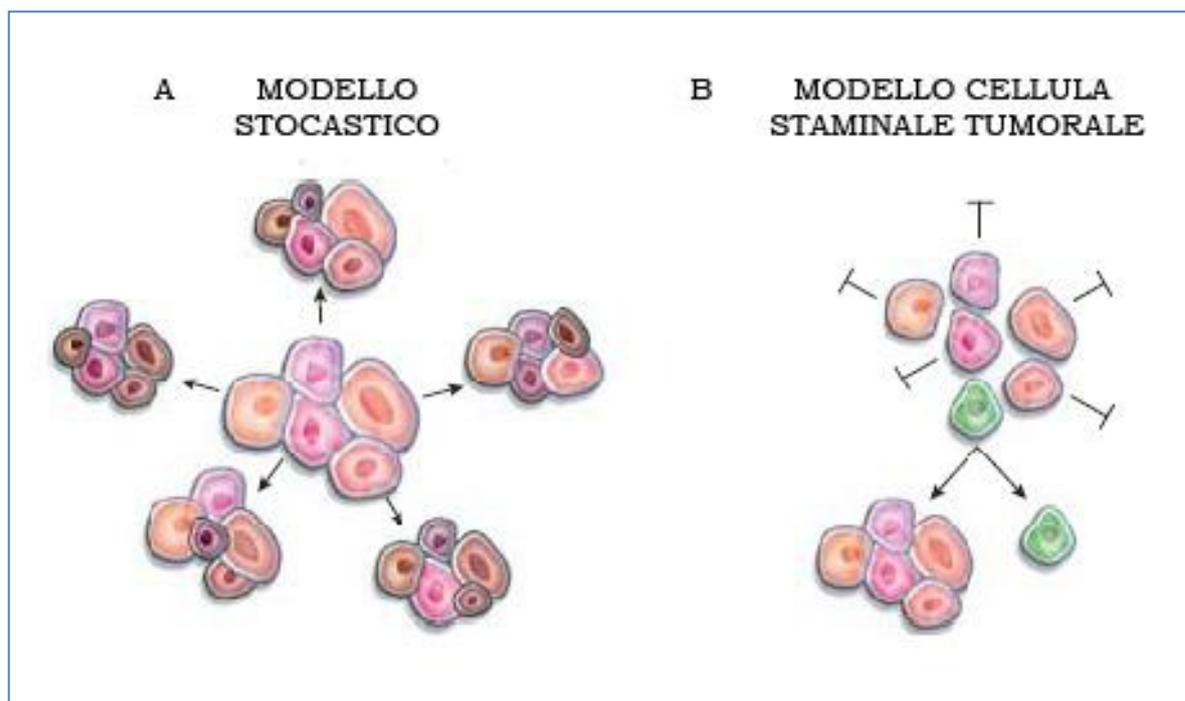
### **3.CELLULE STAMINALI TUMORALI (CSCs Cancer Stem Cell).**

È noto che i tumori si sviluppano a partire da tessuti normali che vanno incontro all'accumulo di alterazioni genetiche che agiscono contemporaneamente dando origine ad un fenotipo maligno. Ad oggi sono stati individuati numerosi geni che quando mutati attivano la trasformazione neoplastica tumori, ma ancora, per la maggior parte dei tumori umani non è nota la popolazione cellulare che subisce tali eventi genetici. Le cellule differenziate, a lungo imputate come origine della massa tumorale presenterebbero delle caratteristiche incompatibili con tale ruolo (57). Ad esempio, le cellule differenziate, specialmente in alcuni distretti corporei come gli epiteli, che vengono rapidamente sostituite a causa del loro rapido turn over cellulare, hanno una bassa percentuale di probabilità che in una singola cellula si accumulino una serie di mutazioni necessarie per la formazione di un tumore. Inoltre, la maggior parte dei tumori sono eterogenei,

composti da cellule che mostrano diversi gradi di differenziamento e di trasformazione, che rende difficile capire come una cellula ben differenziata sia in grado di dare luogo a molteplici tipi di cellule meno differenziate, come quelle tumorali (58). Alla luce di queste considerazioni per gran parte del ventesimo secolo, l'inizio e la progressione dei tumori è stata spiegata attraverso il modello **stocastico**, secondo il quale una cellula, o un gruppo di cellule, diventano tumorigeniche dopo aver acquisito una prima mutazione somatica e, successivamente ulteriori mutazioni genetiche, che inducono proliferazione con la sopravvivenza di cloni cellulari selezionati. Secondo questo modello, il tumore è composto da uno o più cloni con uguale grado di crescita e, quindi, tutte le cellule hanno la stessa probabilità di iniziare e propagare una neoplasia (59) (Fig. 6A)

Il modello presenta però delle limitazioni: da un lato non considera che i tumori sono morfologicamente e funzionalmente eterogenei, dall'altro non considera che per riformare un nuovo tumore è necessario un numero abbondante di cellule. Questa osservazione è in contrasto con l'ipotesi che ogni cellula della massa tumorale possa causare il tumore. Negli ultimi anni è stato proposto un altro modello che, al contrario di quello stocastico, stabilisce che il tumore abbia origine da una popolazione rara di cellule, ovvero **le cellule staminali del**

**cancro o cellule iniziatrici del tumore** secondo il modello **gerarchico** (58,59). Questa popolazione cellulare è reperibile all'interno della massa tumorale e possiede la capacità di autorinnovamento, che garantisce l'eterogeneità gerarchica di alcuni tumori e gioca un ruolo cruciale nell'inizio, nella promozione e nella progressione della neoplasia (59) (Fig. 6B). Inoltre, le cellule staminali tumorali non sarebbero responsabili solo dello sviluppo della neoplasia ma anche dell'aumento dell'aggressività, dello sviluppo di recidive e della comparsa di metastasi (59).

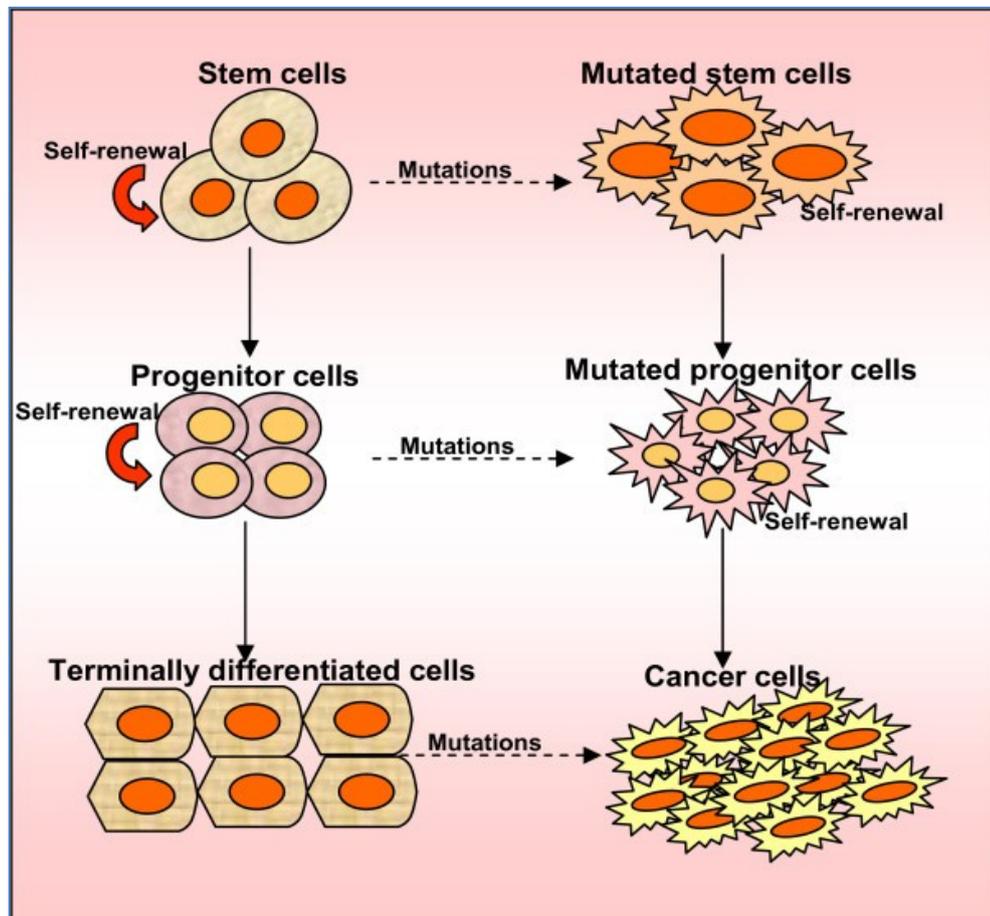


**Fig. 6. Modello stocastico versus modello gerarchico delle cellule staminali tumorali.**

(A) Modello stocastico: potenzialmente tutte le cellule di un tessuto hanno la stessa probabilità di iniziare e propagare la neoplasia. (B) modello gerarchico: il tumore ha origine da una popolazione rara di cellule, ovvero le cellule staminali del cancro o le cellule iniziatrici del tumore (*Wu et al 2008*).

L'implicazione più importante di questa teoria è la possibilità di sviluppare una terapia antiblastica che vada a colpire direttamente le cellule staminali alla base dello sviluppo neoplastico. Infatti, l'inefficace targeting verso questa popolazione di cellule, all'interno del tumore, potrebbe spiegare alcuni fallimenti terapeutici e la ricorrenza di malattia. La maggior parte degli agenti chemioterapici citotossici agisce su cellule in rapida crescita, suggerendo che le cellule staminali del cancro possono sopravvivere a tali trattamenti grazie al loro tasso di proliferazione molto più lento (60). L'origine e la relazione delle CSC con le cellule staminali adulte rimane a tutt'oggi complicata. Alcuni autori hanno postulato che le CSC derivino da cellule staminali adulte mutate sostenendo che, tali cellule, possono causare tumorigenesi alterando i meccanismi molecolari che regolano l'auto-rinnovamento. Le CSC, infatti, impiegano nel processo di nascita le medesime vie di trasduzione del segnale coinvolte nell'auto-rinnovamento delle cellule staminali adulte tissutali, le quali sono normalmente presenti nei tessuti e sono responsabili del loro regolare rinnovamento (61). Sebbene questo sia il caso più probabile, non tutte le cellule tumorali che derivano da cellule staminali adulte mutate sono inevitabilmente cellule staminali tumorali. Inoltre è stato ipotizzato che le CSC possano derivare

dalla trasformazione neoplastica sia di cellule staminali pluripotenti che di cellule progenitrici multipotenti, ma anche da cellule differenziate (62) (Fig.7).

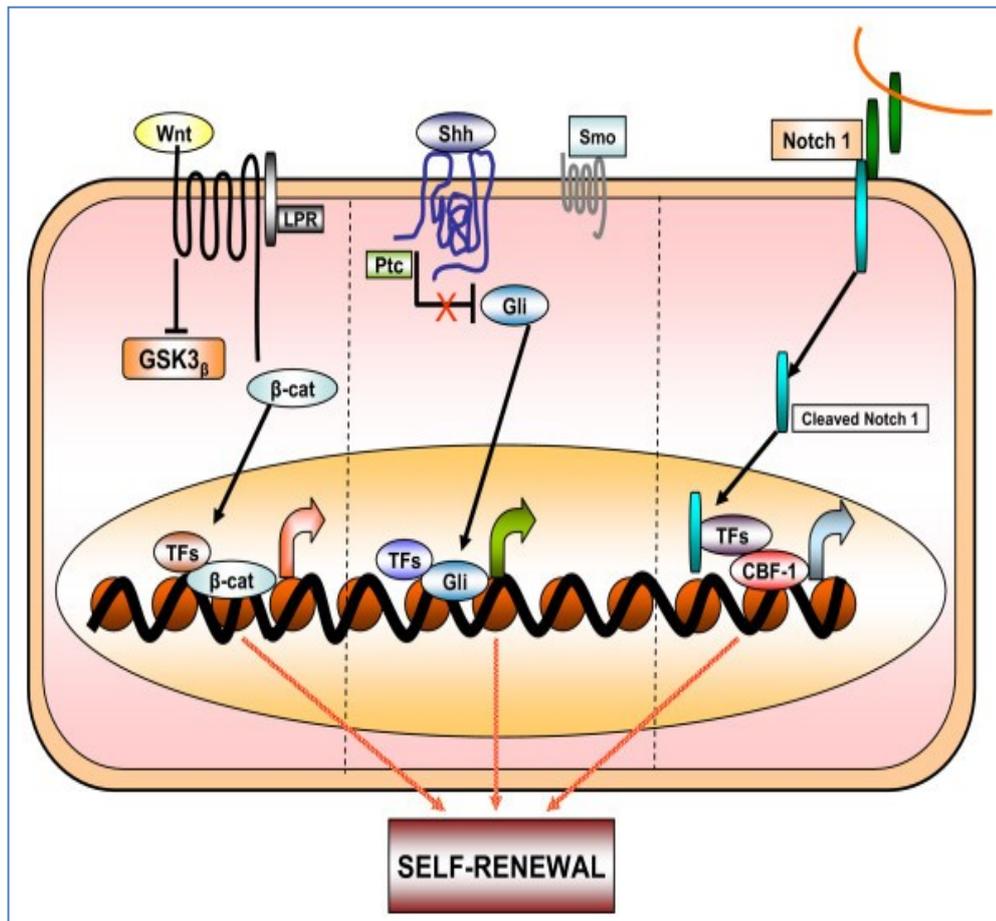


**Fig.7. Origine delle cellule staminali del cancro.**

In questa figura è descritta l'ipotesi secondo la quale le cellule staminali del cancro derivino sia da cellule staminali pluripotenti che da cellule progenitrici multipotenti oppure anche da cellule mature che diventano cellule tumorali a seguito di acquisizione di mutazioni (*Moorthy et al 2008*).

E' stato suggerito, infatti, che cellule somatiche differenziate possono riacquisire proprietà di cellula staminale per riattivazione di vie molecolari che

promuovono l'auto-rinnovamento associato alla trasformazione neoplastica (62) (Fig.8).



**Fig.8. Diagramma schematico delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella biologia delle cellule staminali e delle cellule staminali tumorali.**

Le vie di trasduzione del segnale di Wnt, Shh and Notch1 contribuiscono all'auto-rinnovamento sia di cellule staminali che di cellule progenitrici in diversi organi. Mutazioni di proteine a livello di queste vie portano alla formazione di tumori (Moorthy et al 2008).

Come le cellule staminali adulte, anche le CSCs sono state identificate per la prima volta nel sistema ematopoietico. Le prime evidenze sulla loro esistenza

sono state ottenute negli anni '90 grazie a studi sulla leucemia mieloide acuta (AML) (63). L'identificazione di cellule staminali leucemiche, ha indotto nuove ricerche su altri tipi di tumore, portando alla dimostrazione dell'esistenza di CSCs anche nei tumori solidi. Al-Hajj e collaboratori furono i primi a identificare e isolare una sottopopolazione di cellule dal tumore al seno. Molto più recentemente sono state scoperte in altri tipi di tumori, tra i quali il tumore polmonare, il tumore del colon, dell'ovaio e del pancreas (63). L'identificazione e l'isolamento delle CSCs dai tumori è a tutt'oggi molto complesso e oggetto di studio da parte di tanti ricercatori. In letteratura è dimostrato che le lesioni tumorali sono costituite da popolazioni eterogenee di cellule tumorali in cui la presenza di cellule con caratteristiche staminali può essere evidenziata mediante opportuna analisi fenotipica attraverso biomarcatori molecolari (64).

### **3.1 Marcatori molecolari associati al fenotipo della cellula staminale.**

Un marcatore tumorale può essere definito come una “molecola biologica presente nel sangue, nei liquidi corporei o nei tessuti in grado di definire un processo fisiologico o patologico e di permettere la valutazione della risposta biologica ad un trattamento farmacologico” In questi anni la comunità

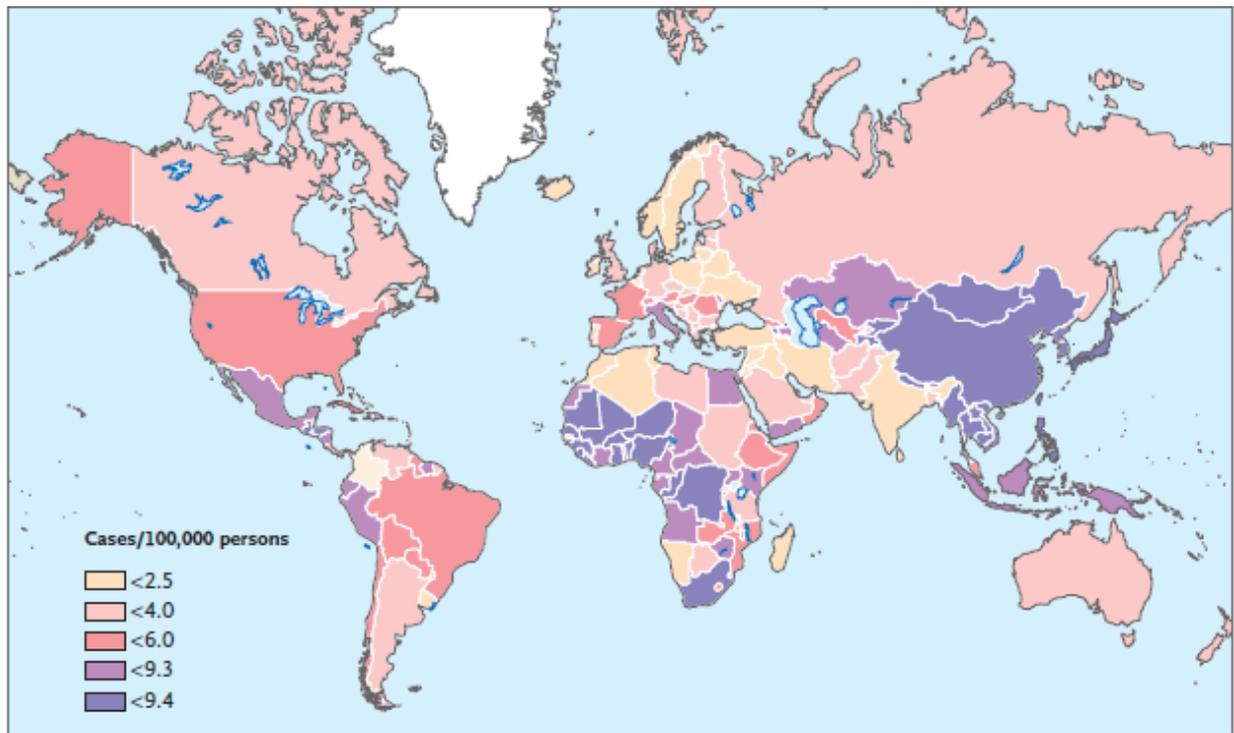
scientifico ha rivolto particolare attenzione all'indagine dei marcatori espressi dalle cellule staminali. Lo studio fenotipico di diverse popolazioni cellulari formate da cellule progenitrici, ha messo in evidenza la presenza di alcuni "Cluster" di differenziazione sulla superficie delle cellule staminali (64). Tra i primi marcatori identificati troviamo CD34, una glicoproteina espressa sulle cellule staminali ematopoietiche e su fibroblasti embrionali. L'antigene CD34 è uno dei marcatori di staminalità più studiato negli ultimi anni, il CD133, anch'esso glicoproteina ritrovata sulla superficie di cellule staminali in diversi tessuti ed organi ma associato anche al fenotipo delle cellule staminali tumorali (64,65). Altri marcatori associati al fenotipo staminale sono CD29 (integrina espressa in cellule staminali di vari organi), CK19 CD44 e CD117 (c-Kit), entrambe recettori, utilizzati come marcatori di cellule staminali tumorali. Risulta importante come la scoperta di nuovi marcatori tumorali, così come la validazione degli stessi, rappresenti un punto cruciale sia nella pratica clinica che nell'acquisizione d'informazioni necessarie alla comprensione dei meccanismi cancerogenetici. Per il mio progetto sono stati scelti marcatori molecolari di cellule staminali tumorali allo scopo di poter individuare tale popolazione cellulare a livello epatico, quali CD133, CD44, CK19 e c-Kit (66).

#### **4. IL CARCINOMA EPATOCELLULARE (Hepatocellular carcinoma-HCC).**

Il carcinoma epatocellulare rappresenta il quinto tumore più comune al mondo e la terza causa di morte per tumore. Sebbene diffuso in tutte le nazioni del mondo, la presenza di differenze significative nell'incidenza dell'HCC nei vari paesi indica la prevalenza di fattori eziologici specifici, geografici, individuali ed etnici. I fattori eziologici associati all'HCC includono infezioni da virus dell'epatite B e C, il consumo cronico di alcool, l'assunzione di cibi contaminati da aflatossina-B1 e numerose forme di cirrosi (67,68) (Fig.9). Sono stati proposti anche altri fattori eziologici associati all'insorgenza dell'HCC nell'uomo, sebbene con incidenza minore. Tali fattori comprendono l'uso a lungo termine di contraccettivi orali nelle donna, alcuni disordini metabolici come l'emocromatosi ereditaria, la porfiria cutanea tardiva, la deficienza di  $\alpha$ 1-antitripsina, la tirosinemia ereditaria, il diabete di tipo II e le steatoepatite non-alcoliche. Anche il sesso influenza il rischio e l'evoluzione dell'HCC: un numero maggiore di casi di HCC si contano, infatti, fra gli individui di sesso maschile (68). Attualmente vi sono più di 1 milione di nuovi casi all'anno. I trattamenti terapeutici per la cura dell'HCC sono estremamente limitati e generalmente inefficaci. Solo in alcuni pazienti con HCC viene fatta una

diagnosi in fasi precoci e ciò rende possibile l'uso di trattamenti terapeutici, quali la resezione chirurgica, trapianto epatico e radioterapia (69). Nella maggior parte dei pazienti con HCC la malattia viene diagnosticata quando è già ad uno stadio avanzato e i potenziali trattamenti curativi risulterebbero inefficaci. Il solo farmaco chemioterapico consentito per il trattamento di HCC allo stadio avanzato è il Sorafenib una piccola molecola che inibisce diversi recettori tirosin-chinasici, ma, complessivamente, l'efficacia del Sorafenib dura solo per alcuni mesi, poiché la via di trasduzione del segnale da esso inibita, viene attivata in altri modi. Risulta necessario fare ulteriori studio per migliorare la prognosi dell'HCC, a tutt'oggi infausta, e sviluppare nuove strategie terapeutiche per il trattamento di HCC in stadio avanzato (70). La ricerca sulla biologia molecolare dell'epatocarcinogenesi ha identificato diversi biomarcatori, che potrebbe fornire informazioni supplementari al fine di comprendere meglio le modificazioni molecolari del carcinoma epatocellulare. Una gran numero di marcatori molecolari hanno dimostrato di avere un potenziale significato predittivo e una grande varietà di essi hanno dimostrato di essere eccellenti strumenti diagnostici per HCC (71). A tal proposito, infatti, la comparsa della teoria della nascita dei tumori dalle cellule staminali tumorali avanza delle ipotesi sulle spiegazioni del perché i trattamenti spesso possono essere visti

inizialmente di successo, ma alla fine si traducono in una mancata eliminazione del tumore e forse anche nello sviluppo di recidive. Così come è stato riscontrato in altri tumori solidi, esistono delle CSC epatiche che potrebbero contribuire allo sviluppo del carcinoma epatocellulare (72). Le nuove tecniche di indagine diagnostica attualmente rappresentano un vantaggio nel determinare un intervento sempre più tempestivo ed efficace; inoltre l'esame dei fegati rimossi dai pazienti che hanno subito il trapianto ha dato l'opportunità di identificare e analizzare lesioni precancerogene e piccoli tumori, consentendo l'individuazione di alterazioni, caratteristiche delle fasi precoci (72,73). Ultimamente, studi di biologia molecolare sull'HCC hanno definito alcuni eventi implicati nella trasformazione maligna del fegato, e reso possibile l'identificazione di diverse vie di trasduzione del segnale deregolate durante la cancerogenesi, responsabili dell'insorgenza, della promozione e della progressione tumorale (74). Recenti evidenze suggeriscono che l'instabilità genomica rappresenta uno degli eventi precoci nell'acquisizione del fenotipo neoplastico (74,75).



**Fig.9. Incidenza dell'HCC nei vari Stati del mondo.**

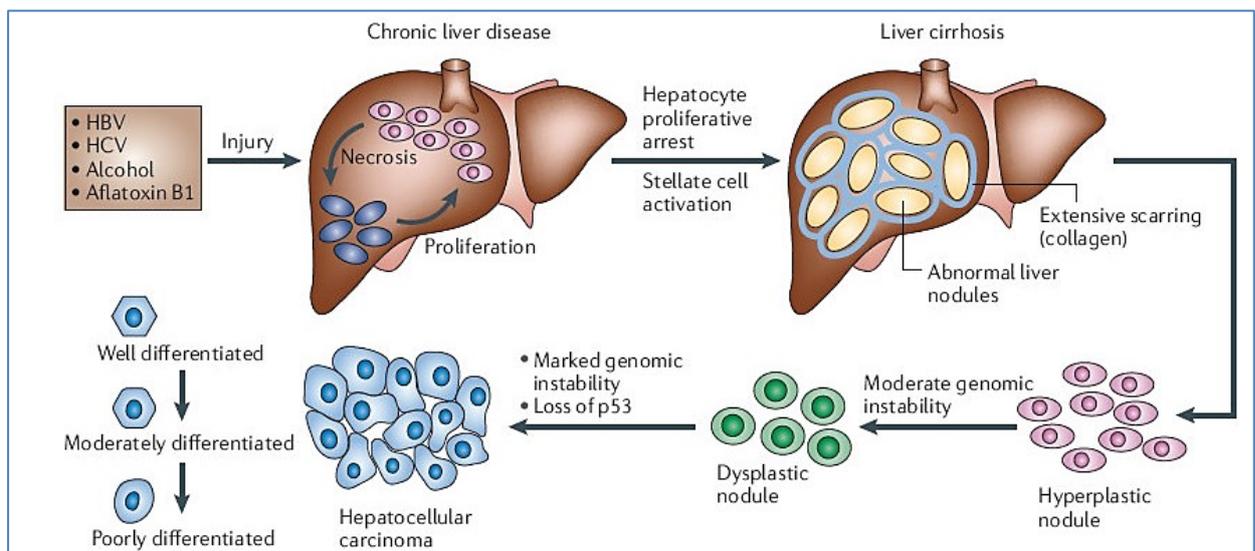
Le variazioni regionali nei tassi di mortalità di HCC riportati per 100.000 persone (*El-Serag, 2011*).

Nel processo di cancerogenesi si distinguono 3 fasi essenziali: una cellula somatica subisce una mutazione; questa fase della trasformazione neoplastica è detta fase di “inizio”. La cellula iniziata si divide dando origine, se non è in grado di riparare il danno, ad una progenie che esibisce la medesima mutazione e/o acquisisce ulteriori alterazioni geniche ed epigenetiche; questa è la fase di “promozione”. Nelle successive divisioni cellulari possono insorgere ulteriori mutazioni geniche gravi e stabili che inducono maggiore malignità e aggressività alle cellule alterate; questa è detta fase di “progressione” (76,77).

L'epatocancerogenesi è un processo multifasico molto complesso fortemente correlato alla presenza di un danno epatico cronico, che solo raramente si manifesta in individui con fegato sano. L'eterogeneità degli agenti eziologici, alla base dello sviluppo e della progressione dell'HCC, si riflettono in un'altrettanto eterogenea gamma di pattern di alterazioni genetiche. Nella fase pre-neoplastica, successivamente al danno cronico indotto da uno o più agenti eziologici, gli epatociti vanno incontro a un'intensa stimolazione mitogenica dovuta all'esposizione ad elevati livelli di fattori di crescita (TGF- $\alpha$ ) e citochine attivate in seguito all'infiammazione dovuta a necrosi cellulare, all'azione di proteine virali e all'intensa risposta rigenerativa successiva alla perdita cellulare; questi fattori possono portare all'attivazione di importanti vie del segnale coinvolte nella proliferazione cellulare. Cicli continui di questo processo necrotico/rigenerativo promuovono un danno cronico che culmina nella cirrosi epatica, caratterizzata dalla formazione di noduli epatici circondati da depositi di collagene. L'elevato tasso di proliferazione cellulare porta all'accumulo di epatociti sensibili a subire alterazioni geniche strutturali (amplificazioni, mutazioni, delezioni e trasposizioni) e allo sviluppo di una popolazione epatocitica monoclonale che andrà a formare foci iperplastici di epatociti fenotipicamente alterati che progrediranno poi nelle successive fasi displastica e

neoplastica, fase, quest'ultima, nella quale i carcinomi epatocellulari potranno essere classificati in base al loro grado di differenziamento (78) (Fig.10).

Per capire le basi molecolari dell'epatocancerogenesi diventa quindi importante individuare sia i meccanismi molecolari che vengono deregolati durante la comparsa della cirrosi epatica, sia l'insieme delle anomalie cromosomiche e delle modificazioni genetiche ed epigenetiche che si verificano durante le fasi dell'epatocancerogenesi (79).



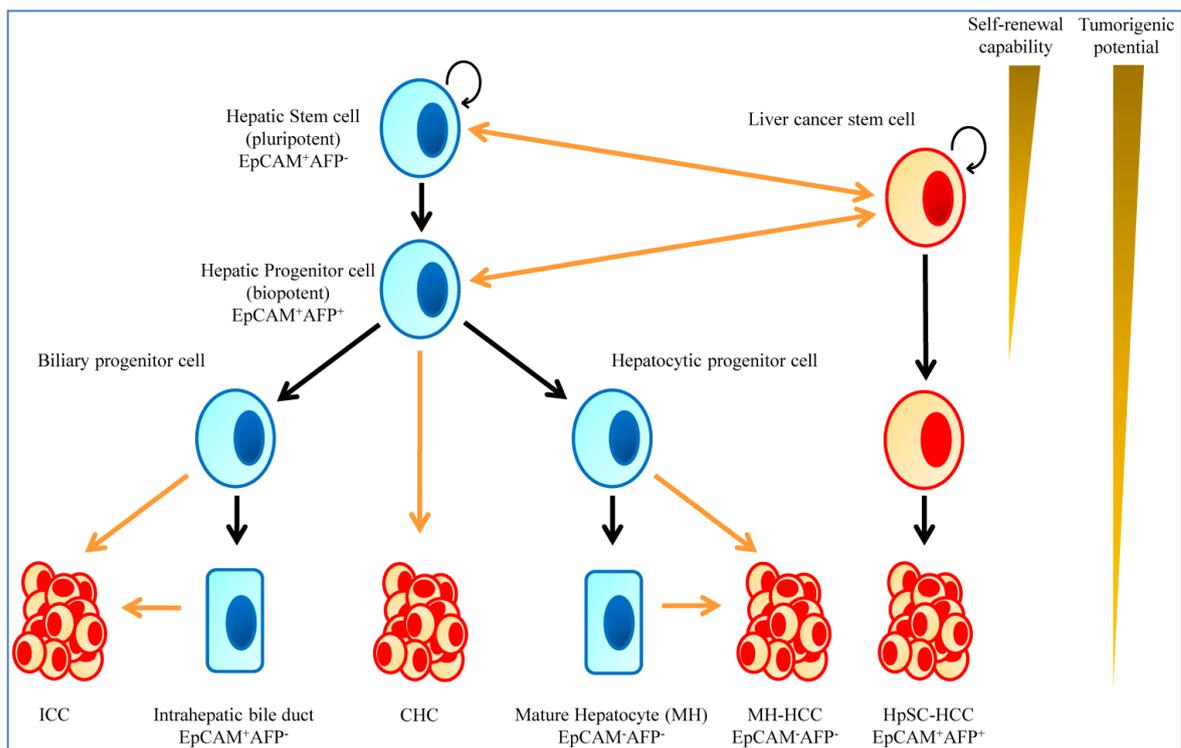
**Fig.10. Progressione istopatologica e caratteristiche molecolari dell'HCC.**

In seguito a danno epatico indotto da uno o differenti fattori eziologici (virus dell'epatite B e C, alcool, aflatoxina B1), vi è necrosi seguita da proliferazione riparativa degli epatociti. Cicli continui di questo processo distruttivo, rigenerativo promuovono una malattia epatica cronica che culmina nella cirrosi epatica. Essa è caratterizzata da anormale formazione dei noduli epatici circondati da deposizione di collagene. Susseguentemente, si ha la formazione di noduli iperplastici, di noduli displastici e, infine, di carcinomi epatocellulari, che possono essere ulteriormente classificati in tumori ben differenziati, moderatamente e scarsamente differenziati, l'ultimo dei quali rappresenta la forma più maligna dei carcinomi epatocellulari umani. (Paraskevi AF et al Nature 2006)

#### **4.1 Teoria della nascita dell'HCC dalle CSCs**

Sebbene la teoria gerarchica delle cellule staminali tumorali sia stata proposta da diversi decenni, la dimostrazione della loro esistenza all'interno delle masse tumorali, si è verificata solo negli ultimi quindici anni. I progressi sono stati raggiunti prima studiando le leucemie acute negli anni '90, e successivamente utilizzando marcatori di superficie, le CSC sono stati più recentemente ritrovate in una gamma crescente di altri tumori solidi, suggerendo che questi tumori maligni possano nascere da tale compartimento cellulare (80). Recentemente, diversi studi hanno postulato che la progressione dell'HCC possa essere guidata da cellule staminali tumorali attraverso la loro capacità di autorinnovamento, di differenziarsi in progenie eterogenea, di divisione illimitata e resistenza alle terapie di elezione. Inoltre, sono stati identificati marcatori biologici di superficie in grado di riconoscere sia le cellule staminali/progenitrici che le CSCs in tessuto tumorale (80,81). Ci sono due principali teorie cellulari di origine del tumore al fegato. Una teoria afferma che il cancro del fegato abbia origine da epatociti maturi che riacquistano il fenotipo di cellula staminale a causa di una mutazione; l'altra teoria (supportata da un numero maggiore di studi) afferma che le cellule tumorali del fegato derivino da cellule staminali

indifferenziate intraepatiche o da un differenziamento aberrante di cellule ovali (82) (Fig.11).

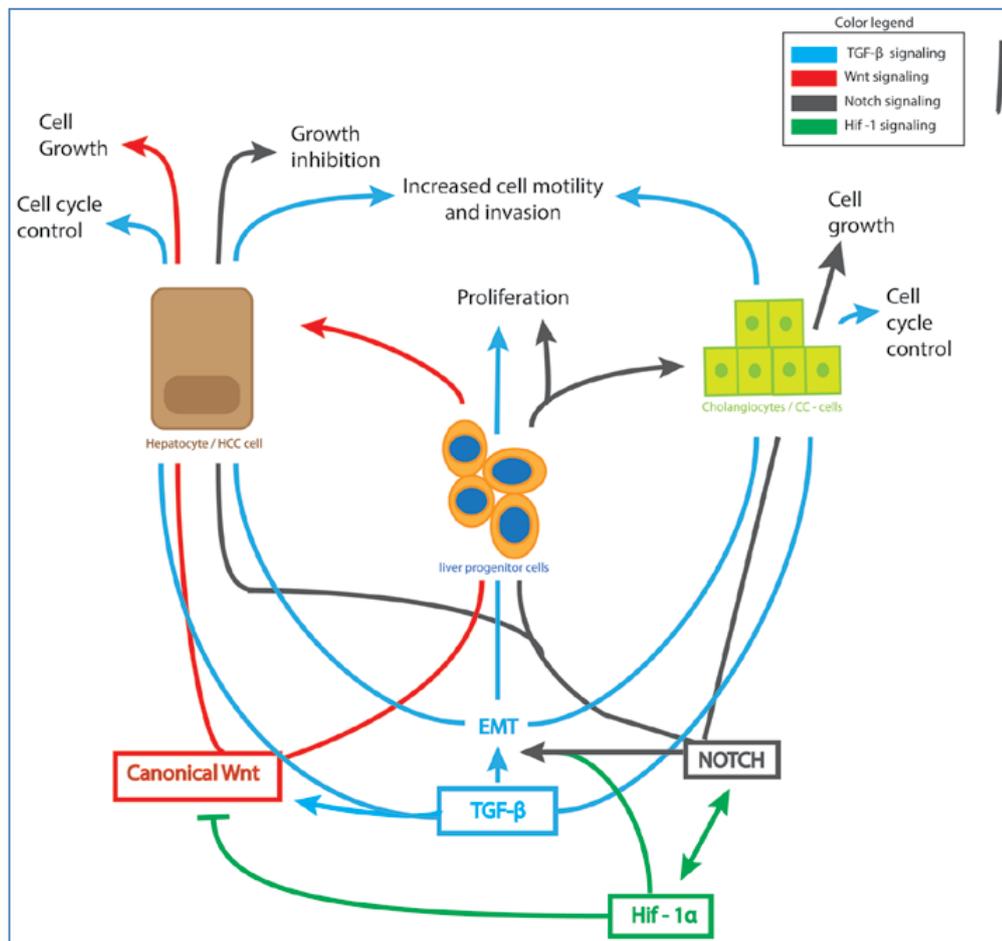


**Fig.11. Cellule Staminali e CSCs nello sviluppo dell'HCC.**

Cellule staminali epatiche normali sono caratterizzate dalla loro capacità di auto-rinnovarsi e differenziarsi in cellule sane del tessuto epatico. Mutazioni oncogeniche nelle normali cellule staminali/progenitrici o anche in cellule differenziate aumentano o migliorano le cellule con capacità di autorinnovamento. Di conseguenza, queste cellule funzionano come cellule staminali tumorali e contribuiscono alla formazione del CE (Naoki Oishi, 2011).

Diversi studi suggeriscono che la de regolazione di alcune vie di trasduzione del segnale in cellule staminali normali conduce alla trasformazione in CSC (82,83)

(Fig.12), che portano all'acquisizione di un fenotipo maligno da parte delle cellule staminali/progenitrici epatiche. L'individuazione di tali vie può aiutare a comprendere meglio la biologia delle cellule staminali tumorali, nonché il loro ruolo nella cancerogenesi epatica (84).



**Fig.12. Rappresentazione schematica del ruolo di Wnt, Notch, TGF-  $\beta$  negli epatociti, colangiociti e nelle cellule progenitrici epatiche nell'epatocancerogenesi.**

Le vie Wnt e Notch promuovono sia la crescita cellulare di epatociti e colangiociti, che il loro differenziamento da cellule progenitrici epatiche. L'equilibrio delle vie di Wnt e Notch è stato proposto come punto cruciale per la determinazione del destino delle cellule progenitrici epatiche. (Eliene Bogaerts, 2014).

## **5.SCOPO DELLA RICERCA.**

L'ipotesi che l'evento chiave nella formazione di un tumore sia rappresentato dalla trasformazione neoplastica di una cellula staminale normale è stato confermato da più dati sperimentali, dapprima nelle leucemie poi in altri tumori solidi, tra cui il tumore epatico (85). Pertanto lo scopo di questo studio è stato quello di individuare la presenza di alcuni marcatori molecolari di cellule staminali tumorali, a livello epatico, per confermare la teoria che l'HCC possa derivare dalla trasformazione di cellule di cellule staminali/progenitrici epatiche. Tali marcatori hanno come target specifico rappresentato dalle cellule trasformate, le quali risultano importanti per cercare di migliorare la prognosi e la cura dei tumori. Sono richiesti ulteriori approfondimenti nell'individuazione di uno o più marcatori molecolari al fine di identificare una terapia mirata ed altamente specifica.

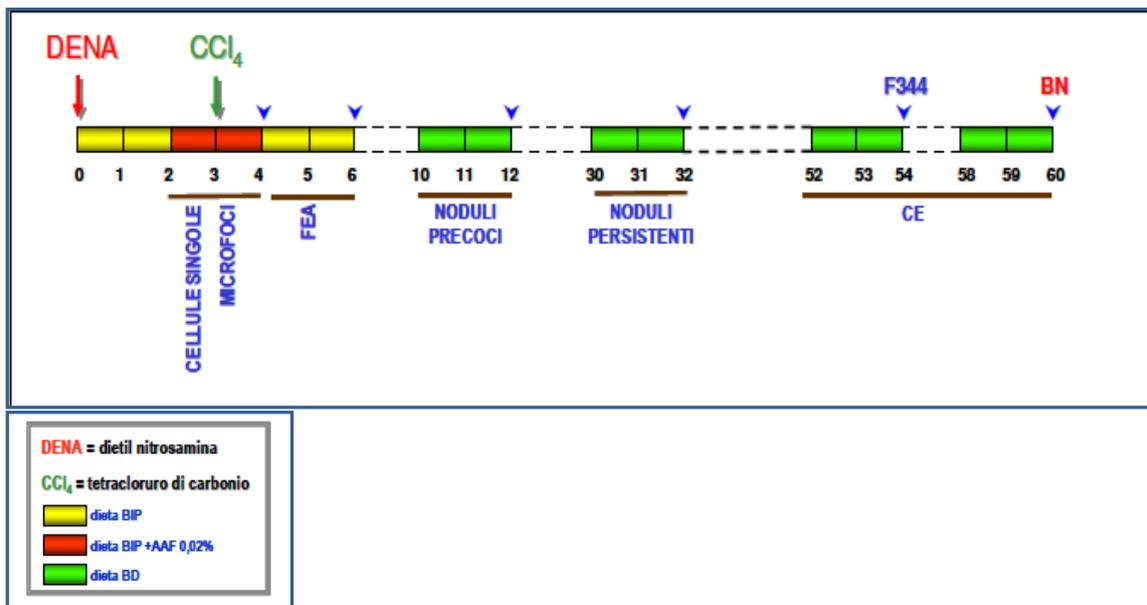
## 6.MATERIALI E METODI

### 6.1. Animali e trattamenti

Per tale studio sono stati utilizzati ratti Fisher 344 (F344) e Brown Norway (BN) (Charles-River-Italia, Calco, Italia) di 140-160g all'inizio del trattamento, sono stati alimentati con dieta standard e con acqua di fonte *ad libitum*. I due ceppi di ratto sono filogeneticamente distanti tra loro e mostrano una diversa suscettibilità allo sviluppo dell'epatocarcinoma indotto chimicamente: i ratti F344 sono suscettibili allo sviluppo del CE, mentre i ratti BN portano i geni della resistenza allo sviluppo dello stesso tumore. I ratti sono stati trattati secondo il modello di Solt&Farber o dell'"epatocita resistente", che include un trattamento iniziante con una singola dose necrogenica di Dietilnitrosamina (150mg/Kg di peso corporeo per via intraperitoneale, DENA), seguita dopo la crescita riparativa, da due settimane di dieta iperproteica contenente il mitoinibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF) allo 0.02%. A metà di tale trattamento, viene somministrato il Tetracloruro di carbonio (CCL4) alla dose di 0.2ml/100g di peso corporeo, mediante gavaggio, come stimolo di crescita (Fig.13) (86) I ratti sono stati sacrificati per dissanguamento dall'aorta toracica, sotto anestesia con etere. Le lesioni tumorali, utilizzate per il mio progetto di

ricerca, sono state isolate 54 settimane dopo l'inizio per il ceppo F344 e a 64 settimane per il ceppo BN

Tutti gli animali hanno ricevuto cure adeguate, ed i protocolli di studio sono stati eseguiti in osservanza delle linee guida delle norme che disciplinano l'utilizzo di animali in laboratorio.



**Fig.13. Modello di Solt & Farber o dell'epatocita resistente.**

Il protocollo prevede una singola dose necrogenica dell'agente iniziante DENA nella dose di 150mg/kg per via intra-peritoneale, seguita, dopo riparazione tessutale con rigenerazione del parenchima epatico, da una dieta iperproteica protratta per 14 giorni, e, per altri 14 giorni, da una dieta iperproteica contenente lo 0.02% di acetilaminofluorene o AAF (un inibitore della proliferazione degli epatociti normali). A metà di tale trattamento, affinché venga stimolata la crescita epatocitaria, viene somministrato il Tetracloruro di carbonio (CCL4) alla dose di 0.2ml/100g di peso corporeo, mediante gavaggio, come stimolo di crescita.

## **6.2 Marcatori tumorali**

Per gli esperimenti effettuati ho utilizzato i seguenti biomarcatori molecolari di cellule staminali e di CSC:

### **CD 133**

Il CD133, o Prominina, esistente in 3 isoforme, è una glicoproteina di superficie (proteina trans membrana) (87,88). La sua espressione nelle cellule tumorali è associata ad angiogenesi tumorale, a comparsa di recidiva e a radiochemioresistenza. Il CD133 è stato associato sia in vitro che in vivo alla crescita e alla progressione tumorale. E' stato isolato ampiamente in cellule staminali sia normali che tumorali ed è usato come marker della divisione asimmetrica, della plasticità staminale, della quiescenza delle cellule tumorali (89); è stato inoltre associato ad una serie di importanti regolatori e vie intracellulari importanti per le cellule staminali tumorali. Il CD133 è stato identificato come promettente markers di CSC in tessuti (soprattutto in neoplasia di origine epiteliale), tra cui quello renale, quello nervoso, quello pancreatico e prostatico (90).

## **CD44**

Appartiene ad una famiglia di glicoproteine transmembrana che presenta varie isoforme. In genere agisce come recettore specifico per l'acido ialuronico, promuovendo la migrazione delle cellule normali ed è altamente espresso in cellule di diversi tumori, nelle sue varie isoforme (90). E' associato principalmente con le proteine che controllano le modificazioni extracellulari e con la regolazione dell'adesione, differenziamento, crescita, sopravvivenza, motilità, migrazione, angiogenesi e differenziamento cellulari; è coinvolto in numerose cascate di segnale complesse che sembrerebbe siano coinvolte nella progressione tumorale. Il gene di CD44 subisce degli splicing alternativi che codifica varie isoforme proteiche nei vari sottotipi di tumori (91). Quindi CD44 è ampiamente usato come marcatore di superficie per riconoscere CSC in vari tipi di tumore, tra i quali il tumore epatico (92).

## **CK19**

Marcatore che fa parte della famiglia delle citocheratine responsabile dell'integrità strutturale delle cellule epiteliali. CK19 fa parte delle citocheratine di tipo I acido, queste proteine si ritrovano fisiologicamente nel citoplasma delle cellule di vari tessuti epiteliali come facenti parte dei filamenti intermedi del

citoscheletro. Usato come marker di cellule tumorali dei colangiociti maturi e cellule progenitrici epatiche. CK19 è usato anche come marker delle cellule dei dotti biliari e CSC (93,94).

### **c-Kit**

Conosciuto anche come CD117, c-Kit è un recettore tirosin-chinasico di tipo III, espresso sulla superficie di cellule staminali ematopoietiche e altre cellule staminali adulte. C-Kit è il recettore del Stem Cell factor (SCF) e costituisce un importante sistema di trasduzione del segnale con funzioni antiapoptotiche e proliferative. Forme alterate di questo recettore sono associate a varie tipologie di tumore. C-Kit gioca un ruolo importante nella sopravvivenza cellulare, differenziamento e proliferazione (95).

## **6.3 Colorazione Immunoistochimica**

La colorazione immunoistochimica sui campioni di tessuto epatico è stata condotta su sezioni seriali di 3µm fissate in formalina al 10% e incluse in paraffina. Abbiamo valutato l'espressione di marcatori molecolari quali CD133 e c-kit, marker di cellule ovali e di epatociti maturi; CK 19 della famiglia delle citocheratine, marker sia di cellule staminali ematopoietiche ma anche di cellule

biliari e di epatociti maturi e CD44 glicoproteina transmembrana, recettore specifico per l'acido ialuronico; promuove la progressione dei tumori; marcatore di cellule ovali e CSCs. Le sezioni sono state sparaffinate con xilolo e reidratate con scala alcolica discendente; dopo il blocco delle perossidasi endogene con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanolo, è stato effettuato lo smascheramento dei siti antigenici (la fissazione in paraffina maschera gli epitopi), con tampone citrato a pH 6 o con tampone Tris EDTA a pH 8.5 con l'utilizzo del forno a microonde. Per lo smascheramento enzimatico, solo per CD133, è stata utilizzata la tripsina (Tris-HCl 0.05M pH 7.8 con aggiunta di 0.250 g di tripsina e 0.250 g di CaCl) con incubazione delle sezioni a 37°C per 30'. Per la colorazione immunohistochimica è stato utilizzato il kit R.T.U.-VECTASTAIN (cod. PK-7800-VECTOR Laboratories) secondo le indicazioni del produttore. L'incubazione con gli anticorpi primari, per un'intera notte a 4°C, è stata eseguita con le seguenti diluizioni: CK19 1:400 (Novus Biologicals NBP1-78278 1.16mg/ml); CD133 1:50 (Abnova PAB 12663 0.5µg/µl); CD44 1:250 (Abcam 65829 0.5ml/ml); c-Kit 1:100 (Novus Biologicals NBP1-72270 0.5mg/ml) La rivelazione della reazione antigene-anticorpo è stata effettuata mediante incubazione con 3,3Diaminobenzidina (5 mg di DAB/10ml TrisHCl 0,05M pH 7,6+0,1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) e i nuclei sono stati contrastati con ematossilina. Le sezioni vengono

disidratate in alcool etilico a concentrazioni crescenti e infine montate su vetrini porta oggetto. Si è, di seguito, valutata la positività delle cellule per i 4 differenti marcatori di interesse contando le cellule positive e negative in aree casuali, al microscopio ottico, su un totale di circa 3000 cellule per i controlli e di circa 4000 cellule per i tumori.

#### **6.4 WESTERN BLOT**

300 mg di tessuto epatico sono stati omogeneizzati in Dounce in un tampone di lisi Lysis Buffer NP-40 al 20% pH 8.0, costituito da: Tris buffer, 50mM; NaCl, 150 mM; NP-40, 1% (detergente non denaturante); fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) 1 mM; aprotinina 10 µg/ml; leupeptina 10 µg/ml (inibitori di proteasi); inibitori di fosfatasi 10 µg/ml condotto in ghiaccio. Gli omogenati sono stati sonicati per 5 secondi e centrifugati a 3000 rpm/10' a 4°C. Dopo l'omogenizzazione i campioni sono stati trattati con gamma binding G-Sepharose beads ed IgG Normal Control (Rabbit, Mouse, Goat). Dal sopranatante ottenuto si è proceduto al dosaggio delle proteine secondo il metodo di Lowry. I campioni proteici (40µg) sono stati sciolti in Sample Buffer, con concentrazione finale di 1X, (Tris HCl 0,1M pH 7,5; SDS 160mg/ml; Beta-

Mercapto-EtanoLo 3mg/ml; Glicerolo 400mg/ml, allo scopo di mantenere lo stato denaturato delle proteine) sono stati caricati su un gel di poliacrilammide al 10% e sottoposti ad elettroforesi con l'apparato Criterion Cell Bio-Rad in Running Buffer Tris-Glicina 10X pH 8,7. Al termine della corsa è stato allestito il trasferimento per permettere alle proteine di essere trasferite su membrana di nitrocellulosa 0.45 µm (Hybond-ECL, Amersham GE Healthcare) con tampone di trasferimento Tris Glicina 1X e Met-OH 20% pH 8,7. E' stata eseguita un'incubazione con Blocking Buffer Pierce Protein Free T20 (Thermoscientific) per 60' a temperatura ambiente sotto agitazione, allo scopo di saturare i siti antigenici aspecifici. Successivamente le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari specifici, che erano stati tutti prodotti nel coniglio: CK19 1:400 (Novus Biologicals NBP1-78278 1.16mg/ml); CD133 1:50 (Biorbyt orb99113 1mg/ml); CD44 1:250 (Abcam 65829 0.5ml/ml); per una notte a temperatura ambiente in tubi di vetro pirex sotto rotazione.

Dopo una serie di lavaggi con TBS 1X/Tween 20 allo 0,01%, si è proceduto con il trattamento delle membrane con appropriato anticorpo secondario HRP-coniugato (Rabbit, Cell Signaling). I livelli proteici di ciascun campione sono stati determinati attraverso l'emissione di chemiluminescenza indotta dalla reazione di un reagente (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity).

L'emissione di chemiluminescenza è stata rilevata con lo strumento Chemidoc MP Imaging System (Bio-rad) e i dati numerici finali sono stati ottenuti in unità arbitrarie con l'analisi mediante software Imaging Lab (Bio-rad), normalizzando la densità delle bande rivelate sui livelli di  $\beta$ -Actina di ciascun campione.

## **6.5 ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Il test t Student è stato utilizzato per verificare la significatività statistica.

Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

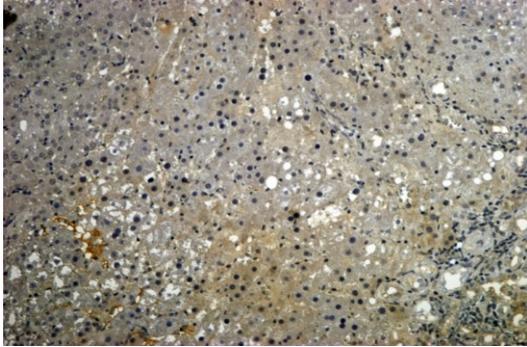
## **7. RISULTATI.**

### **7.1 Risultati immunoistochimica.**

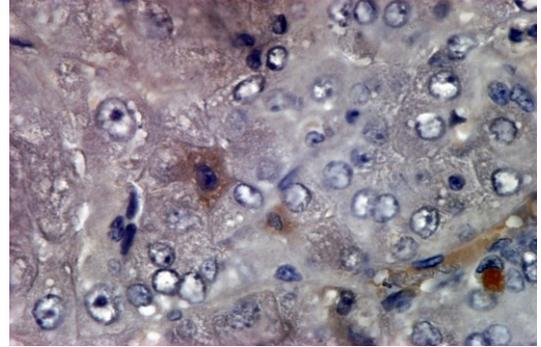
I vetrini contenenti le sezioni dei tessuti e delle lesioni epatiche (Fig.14) che sono stati colorati con tecniche di Immunoistochimica per i quattro marcatori molecolari CK19, CD44, CD133 e c-Kit, sono stati utilizzati per valutare le cellule positive.

In particolare, si è valutata l'espressione dei quattro biomarcatori molecolari calcolando le percentuali positive di ciascuno di essi sul numero totale di cellule contate per entrambe i ceppi di ratto F344 e BN.

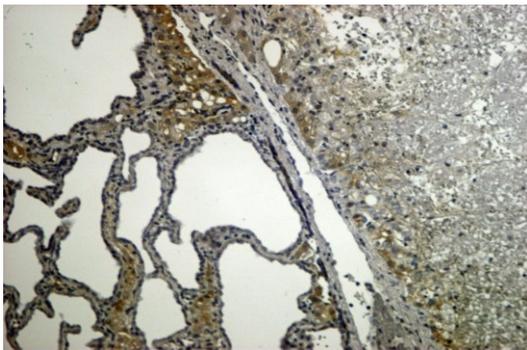
A)HCC F344;



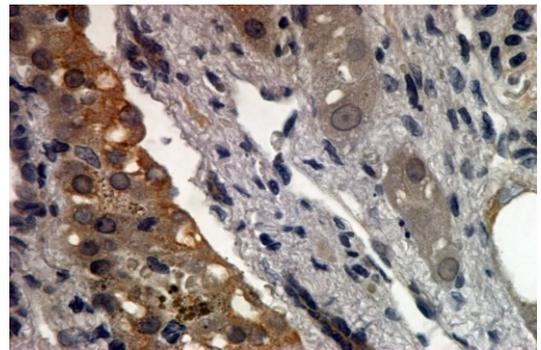
B)HCC F344;



C)HCC BN



D)HCC BN;

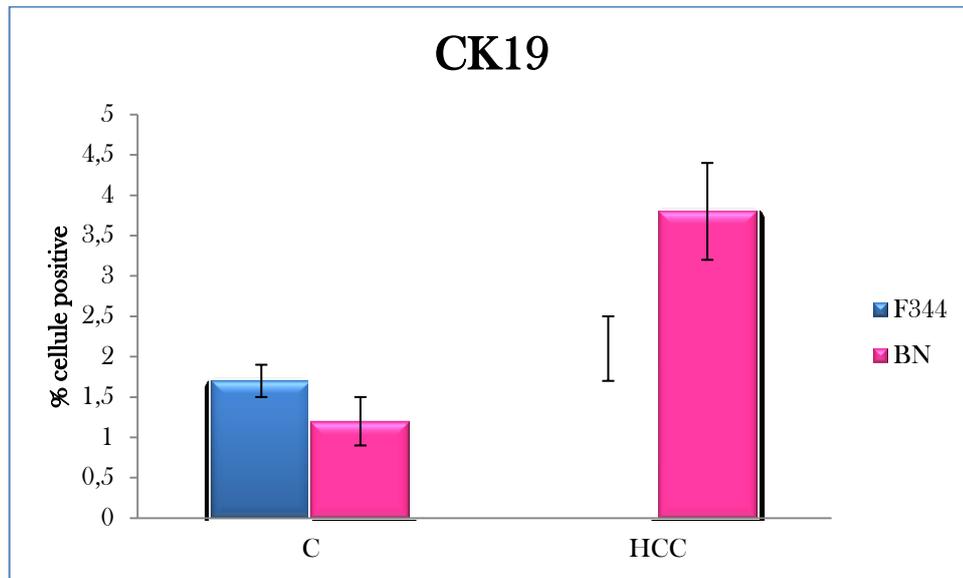


**Fig.14. Immagini di sezioni di HCC trattati con tecniche di immunohistochimica con il marcatore CD133.** Ingrandimento ottico 10x per A e C, 40x per B e D. Dalle immagini dei preparati istologici possiamo notare che gli HCC mostrano intensa e diffusa immunoreattività citoplasmatica ed a tratti anche nucleare per entrambe i ceppi di ratto.

I risultati ottenuti per CK19 sono riportati graficamente nella tabella 1e nella figura 15.

<b>CK 19</b>							
<b>F344</b>				<b>BN</b>			
<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>		<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>	
<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>						
1.4		2.3		0.2		4.4	
1.5		1.7		0.2		4.0	
1.8	<b>1.7</b>	2.5	<b>2.8</b>	0.2	<b>1.2</b>	3.0	<b>3.8</b>
1.7	±0.2	2.4	±0.5	0.5	±0.3	3.9	±0.6
1.9	(5)	1.6	(6)	0.3	(7)		(4)
				0.4			
				0.2			

**Tabella 1.** Espressione di CK19 valutata come % di cellule positive rispetto al totale di cellule contate sia in sezioni di controlli che di HCC nei ceppi di ratto F344 e BN. Per la significatività con il test T-student sono stati ottenuti i seguenti risultati: HCC F344 vs C F344: N.S.; HCC BN vs C BN: p<0.05; HCC F344 vs HCC BN: p<0.05.



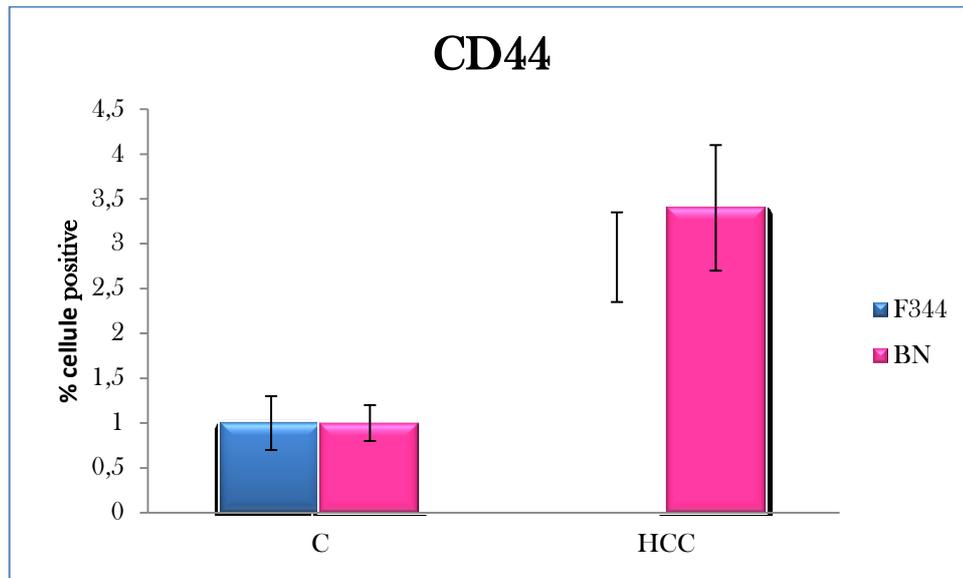
**Fig.15:** Percentuale di cellule positive per CK19 su un numero totale di cellule contate, circa 3000 per i controlli e circa 4000 per gli HCC, sia in controlli che in HCC in sezioni di fegato di ratti F344 e BN.

Dalla figura 15 si può notare come l'espressione di CK19, per il ceppo F344, non mostra una differenza significativa per il tumore rispetto al controllo, infatti la percentuale di positività del tumore è di poco superiore a quella riscontrata nel fegato normale. Per il ceppo BN invece la percentuale di cellule positive nelle sezioni di HCC è significativamente maggiore rispetto al controllo ( $p < 0.05$ ), con una positività nel tumore di circa 3 volte maggiore rispetto al fegato normale.

I risultati ottenuti per CD44 sono riportati graficamente nella tabella 2 e nella figura 16.

<b>CD 44</b>							
<b>F344</b>				<b>BN</b>			
<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>		<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>	
<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>						
1.0		3.2		1.2		4.4	
0.8		2.0		1.0		2.8	
1.3	<b>1.0</b>	3.4	<b>2.8</b>	0.8	<b>1.0</b>	3.0	<b>3.4</b>
0.8	±0.3	2.5	±0.5	0.9	±0.2	3.4	±0.7
1.3	(5)	2.3	(6)	1.1	(7)		(4)
		3.2		1.2			
				1.0			

**Tabella 2.** Espressione di CD44 valutata come percentuale di cellule positive rispetto al totale di cellule contate, sia in sezioni di controlli che di HCC nei ceppi di ratto F344 e BN. Per la significatività è stato utilizzato il test T-student e sono stati ottenuti i seguenti risultati: HCC F344 vs C F344:  $p < 0.05$ .; HCC BN vs C BN:  $p < 0.05$ ; HCC F344 vs HCC BN: N.S.



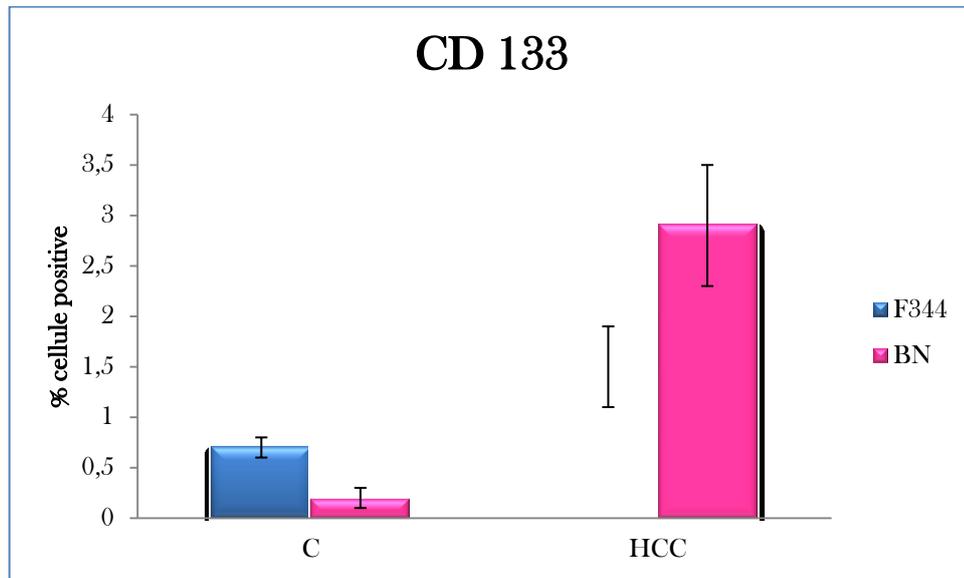
**Fig.16:** Percentuale di cellule positive per CD44 su un numero totale di cellule contate, circa 3000 per i controlli e circa 4000 per gli HCC, sia in controlli che in HCC in sezioni di fegato di ratti F344 e BN.

Il grafico in figura 16 mostra come per l'espressione di CD44 si sia trovato un valore più alto nei tumori rispetto ai propri controlli sia per il ceppo suscettibile F344 ( $p < 0.05$ ) che per il ceppo resistente BN ( $p < 0.05$ ). I tumore del ceppo suscettibile F344 risulta di circa 3 volte maggiore rispetto al proprio controllo, i tumori del ceppo resistente BN risulta maggiore di circa 3,5 volte rispetto al proprio controllo. Non si evidenzia invece una differenza significativa tra i due ceppi per quanto riguarda la percentuale di cellule positive nei tumori.

I risultati ottenuti per CD133 sono riportati graficamente nella tabella 3 e nella figura 17.

<b>CD 133</b>							
<b>F344</b>				<b>BN</b>			
<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>		<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>	
<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>	<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>	<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>	<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>
0.7	<b>0.7</b> ±0.1 (5)	1.5	<b>1.5</b> ±0.4 (13)	0.2	<b>0.3</b> ±0.1 (7)	3.5	<b>2.9</b> ±0.6 (5)
0.6		1.1		0.2		2.1	
0.7		1.0		0.2		2.8	
0.8		2.0		0.5		3.1	
0.5		1.4		0.3		3.0	
		2.0		0.4			
		1.1		0.2			
		1.7					
		0.7					
		1.9					
	1.6						
	1.5						
	1.1						

**Tabella 3.** Espressione di CD133 valutata come percentuale di cellule positive rispetto al totale di cellule contate sia in sezioni di controlli che di HCC nei ceppi di ratto F344 e BN. Per la significatività è stato utilizzato il test T-student e sono stati ottenuti i seguenti risultati: HCC F344 vs C F344:  $p < 0.05$ .; HCC BN vs C BN:  $p < 0.05$ ; HCC F344 vs HCC BN:  $p < 0.05$ .



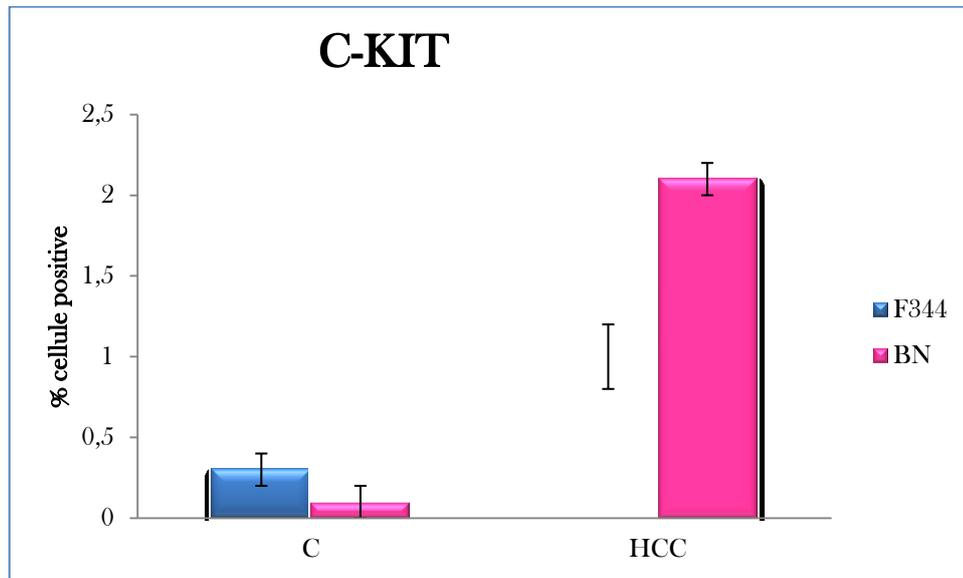
**Fig.17:** Percentuale di cellule positive per CD133 su un numero totale di cellule contate, circa 3000 per i controlli e circa 4000 per gli HCC, sia in controlli che in HCC in sezioni di fegato di ratti F344 e BN.

La figura 17 mostra che la percentuale di cellule positive per CD133 sia più alta nei tumori rispetto ai propri controlli per entrambe i ceppi di ratto ( $p < 0.05$ ). I tumori dei ratti F344 risulta maggiore di circa 2 volte rispetto al proprio controllo, mentre i ratti BN mostrano una positività maggiore dei tumori di circa 9 volte rispetto al proprio controllo. Inoltre si può notare che vi è differenza significativa tra i controlli e tra tumori di entrambe i ceppi di ratto ( $p < 0.05$ ).

I risultati ottenuti per c-Kit sono riportati graficamente nella tabella 4 e nella figura 18.

<b>c-Kit</b>							
<b>F344</b>				<b>BN</b>			
<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>		<b>Controlli</b>		<b>HCC</b>	
<b>% Cellule positive</b>	<b>Media ± DS</b>						
0.4		1.3		0.1		2.3	
0.3		1.0		0.1		2.2	
0.4	<b>0.3</b>	1.0	<b>1.0</b>	0.0	<b>0.1</b>	2.0	<b>2.1</b>
0.2	±0.1	1.2	±0.2	0.2	±0.1	2.0	±0.1
0.3	(5)	0.8	(6)	0.1	(7)	2.0	(5)
		0.9		0.1			
				0.0			

**Tabella 4.** Espressione di CD133 valutata come percentuale di cellule positive rispetto al totale di cellule contate sia in sezioni di controlli che di HCC nei ceppi di ratto F344 e BN. Per la significatività è stato utilizzato il test T-student e sono stati ottenuti i seguenti risultati: HCC F344 vs C F344:  $p < 0.05$ ; HCC BN vs C BN:  $p < 0.05$ ; HCC F344 vs HCC BN:  $p < 0.05$ .



**Fig.18:** Percentuale di cellule positive per c-Kit su un numero totale di cellule contate, circa 3000 per i controlli e circa 4000 per gli HCC, sia in controlli che in HCC in sezioni di fegato di ratti F344 e BN.

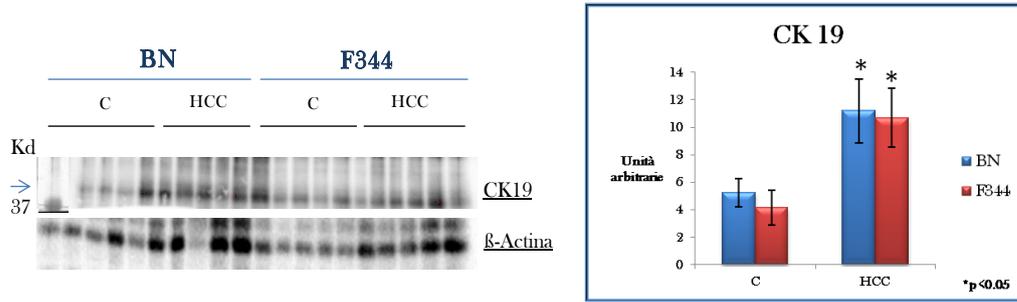
L'espressione proteica di c-Kit mostra un andamento analogo a quello di CD133, nei tumori è iperespresso rispetto ai controlli sia nei ratti F344 che BN ( $p < 0.05$ ); i tumori del ceppo F344 mostrano una percentuale di positività maggiore di circa 3 volte rispetto al proprio controllo; i tumori del ceppo BN invece mostrano una positività maggiore di circa 20 volte rispetto al proprio controllo. Inoltre si può notare che vi è differenza significativa tra i controlli dei due ceppi di ratto F344 e BN ( $p < 0.05$ ), ma anche nei tumori tra i due ceppi ( $p < 0.05$ ).

## 7.2 RISULTATI WESTERN BLOT

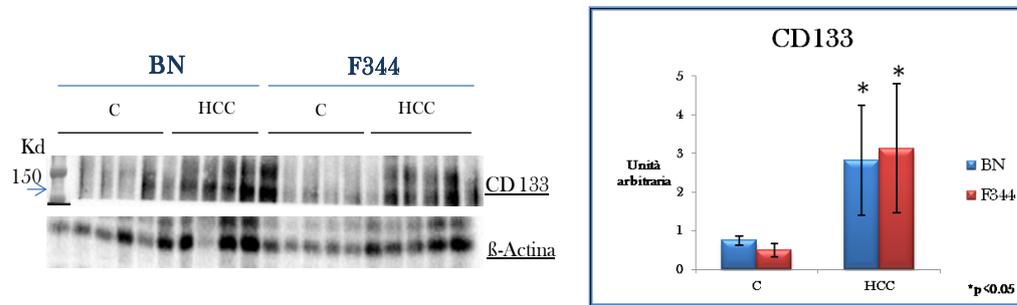
Al livello di sintesi proteica risulta significativo il grado di espressione di tre marcatori molecolari in esame, che è stata valutata nei controlli e nei tumori, in relazione alla presenza o meno di tumore nei due ceppi di ratti.

L'espressione di CK19, CD44 e CD133 è significativamente più elevata nei tumori rispetto ai controlli ( $p < 0.05$ ) e questo è valido sia per il ceppo suscettibile F344 che per quello resistente BN.

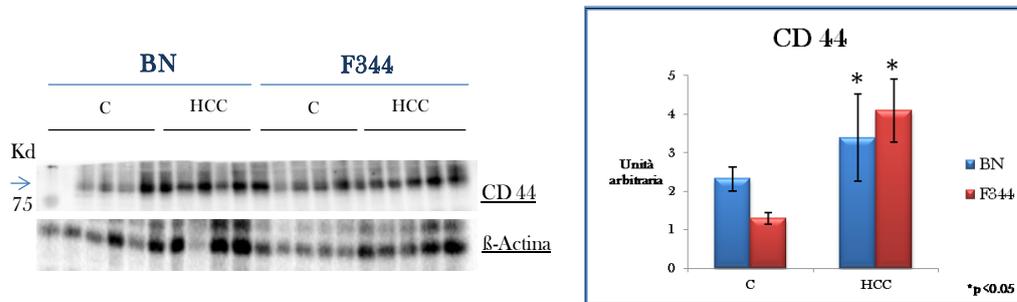
Infatti l'espressione dei tre marcatori nei controlli F344 è significativamente minore rispetto ai tumori dello stesso ceppo. Anche per il ceppo BN, il loro livello di espressione è maggiore negli HCC rispetto ai controlli. Fig.19, 20 e 21.



**Fig.19:** L'espressione proteica di CK19 è maggiore nei tumori rispetto ai propri controlli sia nel ceppo suscettibile F344 che nel ceppo resistente BN (\* $p < 0.05$ ).



**Fig.20:** L'espressione proteica di CD133 è maggiore nei tumori rispetto ai propri controlli sia nel ceppo suscettibile F344 che nel ceppo resistente BN (\* $p < 0.05$ ).



**Fig.21:** L'espressione proteica di CD44 è maggiore nei tumori rispetto ai propri controlli sia nel ceppo suscettibile F344 che nel ceppo resistente BN (\* $p < 0.05$ ). In questo caso possiamo notare che CD44 ha una maggiore espressione nei tumori dei ratti F344 rispetto a quella dei ratti BN

## **8.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Recentemente la comunità scientifica ha rivolto il suo interesse all'identificazione di cellule staminali tumorali all'interno dei tessuti, in quanto sembrerebbe che tali cellule siano direttamente responsabili della crescita tumorale e dell'invasione metastatica. In questo lavoro sono stati studiati marcatori molecolari di staminalità per identificare le cellule staminali tumorali a livello epatico. Sono stati utilizzati markers coinvolti in vie di attivazione cellulare inerenti ai processi di regolazione del ciclo cellulare, proliferazione e apoptosi, quali CK19, CD44, CD133 e c-Kit. Tali marcatori sono stati utilizzati per colorazioni immunohistochimiche, in tessuto normale e tumorale dei ceppi di ratto F344 e BN trattati secondo il modello di Solt & Farber. I risultati ottenuti dalle colorazioni immunohistochimiche, per i marcatori molecolari quali CD133 e c-kit, markers di cellule ematopoietiche e CSC; CK 19 della famiglia delle citocheratine, marker sia di cellule staminali ematopoietiche ma anche di cellule biliari e di epatociti maturi e CD44 glicoproteina transmembrana, recettore specifico per l'acido ialuronico, promuove la progressione dei tumori, marcatore di cellule ovali e CSCs, mostrano tutti e quattro una iperespressione nei tumori del ceppo BN rispetto ai tumori del ceppo F344. Nel caso dell'espressione proteica, analizzata mediante Western Blot, si può notare che i marcatori sono

maggiormente espressi nelle lesioni tumorali rispetto al tessuto normale. I risultati mostrano che CD44 e CD133 siano maggiormente espressi nei tumori del ceppo F344 rispetto al ceppo BN. Il marcatore CK19 invece risulta maggiormente espresso nelle lesioni tumorali del ceppo resistente BN rispetto al ceppo suscettibile F344. Alla luce di questo risultato, ma considerando che si tratta di uno studio preliminare che andrebbe confermato con ulteriori esperimenti, CK19 potrebbe essere considerato un buon marcatore prognostico.

Il nostro studio può quindi fornire delle basi solide per analizzare in modo approfondito le modificazioni molecolari che si verificano durante le fasi tardive dell'epatocancerogenesi. Sarebbe interessante fare uno studio di tale marcatore nelle fasi precoci dell'epatocancerogenesi, per poter migliorare la prognosi e garantire una diagnosi precoce.

L'interesse verso l'individuazione delle CSC, che si sono finora dimostrate le più resistenti alle terapie utilizzate, potrebbe acquisire implicazioni terapeutiche poiché se davvero questa fosse la popolazione di cellule responsabile della crescita tumorale, agendo su di essa, sarebbe possibile arrivare a terapie più mirate per la cura del tumore. In conclusione, i dati da noi ottenuti risultano incoraggianti per il potenziale utilizzo dei biomarcatori molecolari delle cellule staminali come bersagli terapeutici in diverse applicazioni cliniche.

## 9 BIBLIOGRAFIA

- 1) **Sean J. Morrison, Nirao M. Shah, and David J. Anderson.** Regulatory Mechanisms Review in Stem Cell Biology. **1997** Cell, Vol. 88, 287–298.
- 2) **Malcolm Alison.** Liver Stem Cells: a two compartment system. Current opinion in Cell Biology. **1998** Vol 10:710-715.
- 3) **Irving L. Weissman.** Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. **2000.** Cell, Vol. 100, 157–168.
- 4) **Fiona M. Watt and Brigid L. M. Hogan.** Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **2000.** Science Vol 287 25.
- 5) **Carl T. Henningson, Jr, MD, Marisha A. Stanislaus, PhD, and Alan M. Gewirtz, MD.** Embryonic and adult stem cell therapy. **2003.** J Allergy Clin Immunol; Vol 111:S745-53.
- 6) **Elaine Fuchs and Julia A. Segre.** Stem Cells: A New Lease on Life Cell. **2000.** Vol. 100, 143–155.
- 7) **J.-F. Stoltz, N. de Isla, Y. P. Li, D. Bensoussan et al.** Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21st Century. **2015.** Stem Cells International, 19 pages.
- 8) **Christiana Hadjimichael, Konstantina Chanoumidou, Natalia Papadopoulou, Panagiota Arampatzi et al** Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. **2015.** *World J Stem Cells* Vol 7(9): 1150-1184.
- 9) **Adrian K. K. TEO and Ludovic Vallier.** Emerging use of stem cells in regenerative medicine. (2010) *Biochem. J.* Vol 428, 11–23
- 10) **Eliane Gluckman, M.D., Vanderson Rocha, M.D., Agnès Boyer Hammard, M.D., Franco Locatelli et al.** Outcome Of Cord-Blood Transplantation From Related And Unrelated Donors. **1997.** N Engl J Med; Vol 337:373-81.
- 11) **Mihai Girlovanu, Sergiu Susman<sup>1</sup>, Olga Soritau, Dan rus-Ciuca et al.** Stem Cells - Biological Update And Cell Therapy Progress. **2015.** Clujul Medical Vol. 88 no. 3: 265-271.
- 12) **Allan Spradling, Daniela Drummond-Barbosa & Toshie Kai.** Stem cells find their niche. 200. *Nature* Vol 414.
- 13) **George Vassilopoulos and David W Russelly.** Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. **2003.** Current Opinion in Genetics & Development, Vol 13:480–485.
- 14) **Elaine Fuchs, Tudorita Tumber, and Geraldine Guasch.** Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. **2004.** Cell, Vol. 116, 769–778.
- 15) **D. Baksh, L. Song, R. S. Tuan.** Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **2004.** J. Cell. Mol. Med. Vol 8, No 3, pp. 301-316.
- 16) **Olle Lindvall, and Zaal Kokaia.** Stem cells in human neurodegenerative disorders — time for clinical translation? (2010). *J. Clin. Invest.* Vol 120:29–40.

- 17) **Valerie D. Roobrouck, Fernando Ulloa-Montoya, Catherine M. Verfaillie.** Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. (2008) *Experimental Cell Research* 314:1937–1944.
- 18) **Stephen Sullivan and Kevin Eggan.** The Potential of Cell Fusion for Human Therapy. 2006. *Stem Cell Reviews*:341-350.
- 19) **Evangelos Kiskinis and Kevin Eggan.** Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. (2010). *J. Clin. Invest. Vol 120*:51–59.
- 20) **Oh Young Bang.** Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke 2015 *J Clin Neurol*.
- 21) **Donald Orlic, Jan Kajstura, Stefano Chimenti, Igor Jakoniuk et al.** Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. 2001. *Nature Vol 410*.
- 22) **Seyed Jafar Hashemian, Marjan Kouhnavard and Ensieh Nasli-Esfahani.** Mesenchymal Stem Cells: Rising Concerns over Their Application in Treatment of Type One Diabetes Mellitus. 2015. *Journal of Diabetes Research*. 19 pages.
- 23) **Mu-Hui Fu, Chia-Ling, Hsiu-Lien Lin, Pei-Chun Chen.** Stem cell transplantation therapy in Parkinson’s disease. (2015). *SpringerPlus* 4:597.
- 24) **Rudolf Jaenisch, and Richard Young.** Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. 2008. *Cell* 132, 567–582.
- 25) **Shinya Yamanaka.** Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. 2007. *Cell Stem Cell*.
- 26) **J. C. Mountford.** Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. 2008. *Transfusion Medicine*, Vol 18, 1–12.
- 27) **Andrew W. Duncan, Craig Dorrell and Markus Grompe.** Stem Cells and Liver Regeneration. 2009. *Gastroenterology Vol 137*:466–481.
- 28) **Minoru Tanaka, Tohru Itoh, Naoki Tanimizu and Atsushi Miyajima.** Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. 2011. *J. Biochem.*; Vol 149(3):231–239.
- 29) **Marissa Rabelo Tarlá, Fernando Ramalho, Leandra Naira Zambelli Ramalho, Tiago Castro e Silva et al.** Cellular aspects of liver regeneration. 2006. *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 21 (Suplemento 1)*.
- 30) **Luke Boulter, Wei-Yu Lu, and Stuart J. Forbes.** Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. 2013. *J Clin Invest.*; Vol 123. 1867–1873.
- 31) **He´ le`ne Strick-Marchand, Serban Morosan, Pierre Charneau, Dina Kremsdorf, and Mary C. Weiss.** Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. 2004. Vol. 101 no. 22.
- 32) **Stefaan Verhulst, Jan Best, Leo A. van Grunsven, Laurent Dollé.** Advances In Hepatic Stem/Progenitor Cell Biology. 2015. *EXCLI Journal. Vol 14*:33-47.
- 33) **MR Alison, S Islam and S Lim.** Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. 2009. *J Pathol*; Vol 217: 282–298.
- 34) **Claus Kordes and Dieter Häussinger.** Hepatic stem cell niches. 2013. *J Clin Invest. Vol 123(5)*:1874–1880.
- 35) **E. Gaudio, G. Carpino, V. Cardinale, A. Franchitto et al.** New insights into liver stem cells. 2009. *Digestive and Liver Disease Vol 41*. 455–462.

- 36) **Jens U. Marquardt and Snorri S. Thorgeirsson.** Stem Cells in Hepatocarcinogenesis: Evidence from Genomic Data. **2010.** *Semin Liver Dis.* Vol 30(1): 26–34.
- 37) **Emmanuel Farber.** Similarities in the Sequence of Early Histological Changes Induced in the Liver of the Rat by Ethionine, 2-Acetylaminofluorene, and 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene. **1956.** American Association for Cancer Research.
- 38) **Eleftheria Tsolaki, Evangelia Yannaki.** Stem cell-based regenerative opportunities for the liver: State of the art and beyond. **2015.** *World J Gastroenterology;* Vol 21(43): 12334-12350.
- 39) **Carol Man Tong, Stephanie Ma and Xin-Yuan Guan.** Biology of hepatic cancer stem cells. **2011.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* Vol **26**; 1229–1237.
- 40) **Hiroyuki Koike • Hideki Taniguchi.** Characteristics of hepatic stem/progenitor cells in the fetal and adult liver. **2012.** *J Hepatobiliary Pancreat Sci* Vol 19:587–593.
- 41) **Rachael Turner, Oswaldo Lozoya, Yunfang Wang, Vincenzo Cardinale et al.** Human Hepatic Stem Cell and Maturational Liver Lineage Biology. **2011.** *Hepatology.* Vol 53(3): 1035–1045.
- 42) **Janet WC Kung and Stuart J Forbes.** Stem cells and liver repair. **2009.** *Current Opinion in Biotechnology,* Vol 20:568–574.
- 43) **Malcolm Alison.** Liver stem cells: a two compartment system. **1998.** *Current Opinion in Cell Biology,* Vol 10:710-715.
- 44) **Makoto Shibuya Fukuo Kondo Keiji Sano Tadahiro Takada Takehide Asano** Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma. **2011.** *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* Vol 18:537–543.
- 45) **Eric Santoni-Rugiu, Peter Jelnes, Snorri S. Thorgeirsson And Hanne Cathrine Bisgaard.** Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. **2005.** *APMIS* Vol 113: 876–902,.
- 46) **Nelson Fausto, Jean S. Campbell.** The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **2003.** *Mechanisms of Development* Vol 120:117–130.
- 47) **T Roskams.** Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. **2006.** *Oncogene.* Vol 25:3818–3822.
- 48) **Janina E.E. Tirnitz-Parker, George C.T. Yeoh and John K. Olynyk.** Liver Progenitor Cells, Cancer Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma. **2012.** *Liver Regeneration* ISBN 978-953.
- 49) **Beatrice Anfuso, Korri E. El-Khobar, Caecilia H.C. Sukowati, Claudio Tiribelli.** The multiple origin of cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. **2015.** *Clinical Research in Hepatology and Gastroenterology.* No. of Pages 6
- 50) **Rene´ e Deehan and Rebecca Heald.** Epithelial Stem Cells: Stepping out of Their Niche. **2004.** issue of *Cell.*
- 51) **Benjamin Ohlstein, Toshie Kai, Eva Decotto and Allan Spradling.** The stem cell niche: theme and variations. **2004.** *Cell Biology,* Vol 16:693–699.
- 52) **Mikhail Spivakov and Amanda G. Fisher.** Epigenetic signatures of stem-cell identity. **2007.** *Nature Reviews Genetics.*
- 53) **Ricardo Pardal, Michael F. Clarke and Sean J. Morrison.** Applying The Principles Of Stem-Cell Biology To Cancer. **2003.** *Nature Reviews Cancer* Volume 3.

- 54) **John S. Bertram.** The molecular biology of cancer. **2001.** Molecular Aspects of Medicine Vol 21:167-223.
- 55) **Laurie A. Boyer, Tong Ihn Lee, Megan F. Cole, Sarah E. Johnston.** Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. **2005.** Cell, Vol. 122, 947–956.
- 56) **P.G. Nuciforo, F. Fraggetta.** Cancer stem cells: the neoplastic disease from a different view point. **2005.** Pathologica; Vol 97:73-77.
- 57) **Muhammad Al-Hajj, Max S. Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J. Morrison et al.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **2003.** PNAS, Vol. 100 no. 7:3983–3988.
- 58) **Tannishtha Reya, Sean J. Morrison, Michael F. Clark & Irving L. Weissm.** Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **2001.** Nature Vol 414.
- 59) **Catherine J. Wu.** Immunologic targeting of the cancer stem cell. **2008.** C.J., Immunologic targeting of the cancer stem cell. StemBook.
- 60) **Pu Xia, Xiao-Yan Xu.** PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. **2015.** Am J Cancer Res; Vol 5(5):1602-1609.
- 61) **Michael F. Clarke.** Self-Renewal and Solid-Tumor Stem Cells. **2005.** Biology of Blood and Marrow Transplantation. Vol 11:14–16.
- 62) **Moorthy P Ponnusamy and Surinder K Batra.** Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. **2008.** Journal of Ovarian Research, 1:4.
- 63) **Jaffer A.Ajani, Shumei Song, Howard S.Hochster and IraB.Steinberg.** Cancer Stem Cells: The Promise and the Potential. **2015.** Seminars in Oncology, Vol 42,No2,Suppl1,S3-S17.
- 64) **Maurizio Romano, Francesco De Francesco, Giuseppe Pirozzi, Enrico Gringer et al** Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to hepatocellular carcinoma. **2015.** Oncoscience, Vol.2, No.5.
- 65) **Denisa L Dragu, Laura G Necula, Coralia Bleotu, Carmen C Diaconu, Mihaela Chivu-Economescu.** Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. **2015.** World J Stem Cells; Vol 7(9): 1185-1201.
- 66) **Sha-sha Wang, Jian Jiang, Xin-hua Liang, Ya-ling Tang.** Links between cancer stem cells and epithelial– mesenchymal transit. **2015.** OncoTargets and Therapy. Vol 8: 2973–2980.
- 67) **Erik S. Knudsen, Purva Gopal, and Amit G. Singal.** The Changing Landscape of Hepatocellular Carcinoma Etiology, Genetics, and Therapy. **2014.** The American Journal of Pathology, Vol. 184, No. 3.
- 68) **Manojkumar Bupathia, Ahmed Kasebb, Funda Meric-Bernstama, Aung Nainga.** Hepatocellular carcinoma: Where there is unmet need. **2015.** Molecular Oncology.
- 69) **Hashem B. El-Serag.** Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. **2012.** Gastroenterology. Vol 142:1264–1273.
- 70) **Hashem B. El-Serag.** Hepatocellular Carcinoma. **2011.** N Engl J Med. Vol 365:1118-27.
- 71) **Hashem B. El-Serag And K. Lenhard Rudolph.** Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **2007.** Gastroenterology. Vol 132:2557–2576.

- 72) **Beatrice Anfuso • Claudio Tiribelli •Caecilia H. C. Sukowati.** Recent insights into hepatic cancer stem cells. **2014.** *Hepatology* Vol 8 (Suppl 2):S458–S463.
- 73) **Alejandro Forner, Josep M Llovet, Jordi Bruix.** Hepatocellular carcinoma. **2012.** *Lancet.* Vol 379: 1245–55.
- 74) **Tetsuhiro Chiba, Akihide Kamiy, Osamu Yokosuka, Atsushi Iwama.** Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. **2009:** Recent progress and perspective. *Cancer Letter.* Vol.286: 145–153.
- 75) **Lisa P Waller, Vrushak Deshpande, Nikolaos Pylsopoulos.** Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. **2015.** *World J Hepatology* Vol 7(26): 2648-2663.
- 76) **Calvisi DF, et al.** Deregulation of signalling pathways in prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma: Novel insights from interspecies comparison. **2012.** *Biochimica et Biophysica Acta;*1826:215–237.
- 77) **F. Feo, M.R. De Miglio, M.M. Simile, M.R. Muroli, D.F. Calvisi, M. Frau, R.M. Pascale.** Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. **2006.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 126 – 147.
- 78) **Paraskevi A. Farazi and Ronald A. DePinho.** Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **2006.** *Nature Reviews Cancer* Vol.6.
- 79) **Snorri S. Thorgeirsson & Joe W. Grisham.** Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **2002.** *Nature genetics* Vol 31.
- 80) **Taro Yamashita and Xin Wei Wang** Cancer stem cells in the development of liver cancer. **2013.** *J Clin Invest.;* Vol.123(5):1911–1918.
- 81) **Seung Kew Yoon** The Biology of Cancer Stem Cells and Its Clinical Implication in Hepatocellular Carcinoma. **2012.** *Gut and Liver,* Vol. 6, pp. 29-40-
- 82) **Naoki Oishi and Xin Wei Wang** Novel therapeutic Strategies for Targeting Liver Cancer Stem Cells. **2011.** *Int. J. Biol. Sci.* Vol. 7.
- 83) **Eliene Bogaerts, Femke Heindryckx, Yves-Paul Vandewynckel, Leo A. Van Grunsven And Hans Van Vlierberghe** The roles of transforming growth factor- $\beta$ , Wnt, Notch and hypoxia on liver progenitor cells in primary liver tumours. **International 2014.** *Journal Of Oncology.* Vol 44: 1015-1022,
- 84) **Carol Man Tong, Stephanie Ma and Xin-Yuan Guan** Biology of hepatic cancer stem cells. **2011.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* Vol **26:** 1229–1237.
- 85) **Bo Wang1 and Samson T Jacob** Role of cancer stem cells in hepatocarcinogenesis. **2011.** *Genome Medicine.* Vol 3.
- 86) **Dennis B. Solt, DMD, Alan Medline, MD, and Emmanuel Farber, MD, PhD.** Rapid Emergence of Carcinogen-Induced Hyperplastic Lesions in a New Model for the Sequential Analysis of Liver Carcinogenesis. **1977.** *American Journal of Pathology.* Vol 88 N3.
- 87) **S Ma,TK Lee, B-J Zheng, KW Chan and X-Y Guan.** CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. **2008.** *Oncogene* Vol 2:1749–1758.
- 88) **Atsushi Suetsugu, Masahito Nagaki, Hitomi Aoki, Tsutomu Motohashi et al.** Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor

- cells. **2006**. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol 351: 820–824.
- 89) **Anthony W H Chan, Joanna H M Tong, Stephen L Chan, Paul B S Lai & Ka-Fai.** Expression of stemness markers (CD133 and EpCAM) in prognostication of hepatocellular carcinoma. **2014**. Histopathology. Vol 64: 935–950.
- 90) **Zheng Zhu, Xiangfang Hao, Mingxia Yan, Ming Yao et al.** Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133/CD44 population in hepatocellular carcinoma. **2010**. Int. J. Cancer. Vol 126: 2067–2078.
- 91) **Junko Kon, Hidekazu Ooe, Hideki Oshima, Yamato Kikkawa, Toshihiro Mitaka.** Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. **2006**. Journal of Hepatology. Vol 45: 90–98.
- 92) **Ryounggo Kim, Sang Bum Kim, Eung-Ho Cho, Sun Hoo Park et al.** CD44 expression in patients with combined hepatocellular cholangiocarcinoma. **2015**. Ann Surg Treat Res. Vol 89: 9-16.
- 93) **Smita Mary Matthai & Banumathi Ramakrishna.** Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma -an immunohistochemical study with histopathological association. **2015**. Indian J Med Res. Vol 142: 391-398.
- 94) **Chien-Chang Chiu Guan-Tarn Huang Shiu-Huey Chou Chiang-Ting Chien et al.** Characterization of cytokeratin 19-positive hepatocyte foci in the regenerating rat liver after 2-AAF/CCl4 injury. **2007**. Histochem Cell Biol Vol. 128:217–226.
- 95) **Tu"men Mansuroglu, Pierluigi Ramadori, Jo" zsef Duda's, Ihtzaz Malik et al** Expression of stem cell factor and its receptor c-Kit during the development of intrahepatic cholangiocarcinoma. **2009**. Laboratory Investigation. Vol 89: 562–574.