



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE
INDIRIZZO: PATOLOGIA E CLINICA DELL'APPARATO LOCOMOTORE E DEI
TESSUTI CALCIFICATI

CICLO XXIX°

COORDINATORE Prof. Francesco Annunziato

**STUDI *IN VITRO* SU CELLULE STAMINALI TUMORALI
NEGLI OSTEOSARCOMI**

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

Dottorando
Dott.ssa Palmini Gaia



Tutore
Prof.ssa Maria Luisa Brandi

Coordinatore
Prof. Francesco Annunziato

Anni 2013/2016

A mia zia e alla mia speciale famiglia

Indice

SINTESI	1
1. INTRODUZIONE	
1.1 OSTEOSARCOMA	2-6
1.2 CELLULE STAMINALI	7-12
1.2.1 Cellule staminali adulte	8-9
1.2.2 Cellule staminali embrionali	10-11
1.2.3 Cellule staminali tumorali	11-12
2. SCOPO DELLA TESI	13
3. MATERIALI E METODI	
3.1 COLTURE CELLULARI	14-19
3.1.1 Colture primarie e linee cellulari finite di osteosarcoma	14-16
3.1.2 Saggio delle sfere per l'isolamento delle cellule staminali tumorali da osteosarcoma	17-18
3.1.3 Colture di cellule staminali tumorali di osteosarcoma	19

3.2 ANALISI <i>IN VITRO</i> PER LA CARATTERIZZAZIONE	
DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI	20
3.2.1 Tecniche di biologia cellulare	21-40
3.2.1.1 Analisi della crescita delle OS-CSCs	21
3.2.1.2 Saggio delle unità formanti colonie	21-22
3.2.1.2.1 Allestimento del saggio	22-23
3.2.1.3 Agar soft	23
3.2.1.3.1 Allestimento del saggio	24
3.2.1.4 Differenziazione osteogenica	25
3.2.1.4.1 Valutazione dell'attività della fosfatasi alcalina	26
3.2.1.4.1.1 Colorazione citochimica della Fosfatasi Alcalina	26
3.2.1.4.1.2 Dosaggio fluorimetrico della Fosfatasi Alcalina sul soprannatante di cellule in coltura	27
3.2.1.4.2 Valutazione della formazione dei depositi di idrossiapatite	28
3.2.1.4.2.1 Colorazione citochimica dei depositi di HA	28
3.2.1.4.2.2 Dosaggio fluorimetrico dei depositi di HA	28-29

3.2.1.5 Differenziazione adipogenica	30
3.2.1.6 Saggio dell'attività enzimatica dell'Aldeide Deidrogenas	31
3.2.1.6.1 Allestimento del dosaggio enzimatico	31
3.2.1.7 Colorazione in immunofluorescenza	32
3.2.1.7.1 Metodica	32-34
3.2.1.8 Analisi dell'immunofenotipo mediante citofluorimetria a flusso	35
3.2.1.8.1 Metodica	36
3.2.2 Tecniche di biologia molecolare	37-40
3.2.2.1 Estrazione RNA	37
3.2.2.2 Reazione di restrotrascrizione	38-39
3.2.2.3 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	39-40

4.RISULTATI

4.1 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE PRIMARIE E DELLE LINEE CELLULARI FINITE DI OSTEOSARCOMA	41-44
---	-------

4.2 SAGGIO DELLE SARCOsfERE: FORMAZIONE E ISOLAMENTO	45-47
4.3 LINEE CELLULARI STAMINALI TUMORALI DA OSTEOSARCOMA	48
4.3.1 Valutazione della proliferazione cellulare	49-50
4.3.2 Valutazione della capacità clonogenica	51
4.3.3 Valutazione in vitro della capacità tumorigenica	52
4.3.4 Valutazione della capacità differenziativa	53
4.3.4.1 Differenziazione osteogenica	53
4.3.4.1.1 Valutazione qualitativa dell'attività della fosfatasi alcalina...	53-55
4.3.4.1.2 Dosaggio fluorimetrico dell'attività della fosfatasi alcalina	56-57
4.3.4.1.3 Valutazione qualitativa della formazione dei depositi di HA	58-59
4.3.4.1.4 Dosaggio Fluorimetrico dei depositi di idrossiapatite	60
4.3.4.2 Differenziazione adipogenica	61-62
4.3.5 Valutazione dell'attività della aldeide deidrogenasi	63

4.3.6	Analisi citofluorimetrica del profilo dei marker di staminalità mesenchimale	64-65
4.3.7	Analisi in microscopia confocale dell'espressione dei marker di staminalità mesenchimale, embrionale e tumorale	66
4.3.7.1	CD44	67
4.3.7.2	CD105	68
4.3.7.3	STRO-1	69
4.3.7.4	Nanog, Sox2, KLF4 e POU5F1	70-72
4.3.7.5	CD117 e CD133	73-74
4.3.8	Seconda generazione di sarcosfere	75-76
4.3.9	Espressione dei geni della staminalità e della tumorigenicità	77
5.	DISCUSSIONE	78-80
6.	CONCLUSIONI	81
7.	BIBLIOGRAFIA	82-91

Sintesi

Tra i tumori ossei l'osteosarcoma (OS, *Osteosarcoma*) è il tumore primitivo più diffuso. Tumore ad istio genesi mesenchimale, comprende diversi istotipi, classificati sulla base delle caratteristiche cliniche, radiografiche e microscopiche. Tra questi quello a maggior incidenza in età pediatrica e giovanile adulta è l'OS convenzionale (osteoblastico, condroblastico e fibroblastico), il quale risulta essere una delle varianti ad alto grado di malignità, insieme all'OS teleangectasico (OST, *Telangiectatic Osteosarcoma*) e all'OS a piccole cellule (SCO, *Small Cell Osteosarcoma*). In questi anni, nonostante la chirurgia e la farmacologia abbiano fatto notevoli progressi, la percentuale di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi di OS rimane molto bassa. Questo rende ancora oggi l'OS la seconda causa di morte per cancro nei bambini e nei giovani adulti. Un nuovo approccio nella battaglia contro l'OS, e guidato dalla ricerca scientifica, è rappresentato dallo studio e dallo sviluppo di terapie specifiche, basate sugli studi delle caratteristiche molecolari e biologiche di questi tumori primari ossei.

Recenti studi sulla presenza all'interno della massa tumorale primaria di una sottopopolazione cellulare, costituita da cellule dotate di proprietà tipiche delle cellule staminali, tanto da essere per questo definite cellule staminali tumorali (CSCs, *Cancer Stem Cells*) hanno aperto a nuovi studi anche nell'ambito dei tumori ossei, tra cui l'OS. La loro identificazione e lo studio del loro ruolo nella crescita, nel mantenimento e nel potenziale metastatico dei tumori hanno portato i ricercatori ad identificare in queste cellule tumorali, ma indifferenziate, dei possibili, importanti target per lo sviluppo di efficaci terapie tumorali. Secondo i vari studi sarebbe, infatti, proprio la mancata eradicazione delle CSCs dal tumore primario la possibile spiegazione del perché i trattamenti (i.e. chirurgici, chemio- e radioterapici) danno inizialmente risultati molto positivi, ma poi, a distanza di anni, i pazienti, invece, manifestano o la ricomparsa del tumore primario e/o addirittura metastasi in altre sedi anatomiche.

Alla luce di quanto sopradescritto abbiamo preso in esame diversi campioni umani di OS, al fine di isolare le CSCs e stabilire così modelli cellulari di OS-CSCs (*Osteosarcoma Cancer Stem Cells*) per individuare caratteristiche peculiari e/o marcatori genetici e molecolari che le contraddistinguono dalle altre cellule differenziate di OS, cosicché possano essere utilizzati quali possibili bersagli per lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie.

1. INTRODUZIONE

1.1. OSTEOSARCOMA

Tra i sarcomi, un eterogeneo gruppo di neoplasie connettivali che originano dal mesoderma embrionale [1], troviamo i sarcomi ossei e i sarcomi dei tessuti molli.

I sarcomi ossei, un gruppo estremamente raro di tumori primari, comprendono diverse tipologie (i. e. condrosarcoma, osteosarcoma e il sarcoma di Ewing) e sono, all'interno della classe dei sarcomi, le neoplasie più diffuse [2, 3]. L'osteosarcoma (OS) è il tumore primitivo dell'osso più diffuso in età pediatrica e giovane adulta, rappresentando il 60% di tutti i sarcomi ossei diagnosticati in questa fascia di età [4, 5]. Il suo tasso d'incidenza è di circa 2 casi su un milione d'individui all'anno [6].

L'OS, tumore ad origine mesenchimale, presenta diverse varianti, che sono state classificate sulla base delle loro caratteristiche cliniche, radiografiche e istologiche. Ad oggi sono state classificate le seguenti tipologie di OS, quali:

- OS convenzionale (o centrale o classico);
- OS teleangectasico;
- OS a piccole cellule;
- OS centrale a basso grado di malignità;
- OS della superficie (parostale, periosteale, di superficie ad alto grado);
- OS su malattia di Paget (una malattia metabolica ossea in cui gli osteoclasti aumentano il riassorbimento osseo e stimolano di conseguenza la formazione di nuovo tessuto osseo da parte degli osteoblasti);
- OS secondario a lesioni preesistenti;
- OS della mandibola;
- OS in condrosarcoma dedifferenziato;
- OS multicentrico;
- OS post-irradiazione.

L'OS convenzionale (OSA), che fu definito nel 1979 come una neoplasia ad alto grado di malignità, intraossea, nella quale le cellule neoplastiche producono matrice osteoide e ossea [7] è, tra le tipologie di OS indicate, la forma più diffusa.

A sua volta, l'OSA presenta, sulla base delle caratteristiche radiologiche e istologiche tre varianti, quali: l'OSA osteoblastico (Figura 1A), l'OSA condroblastico (Figura 1B) e l'OSA fibroblastico (Figura 1C). Tra queste la variante più diagnosticata risulta essere la forma osteoblastica, con un'incidenza del 60%, sull' 80% di casi di OSA diagnosticati [8-10].

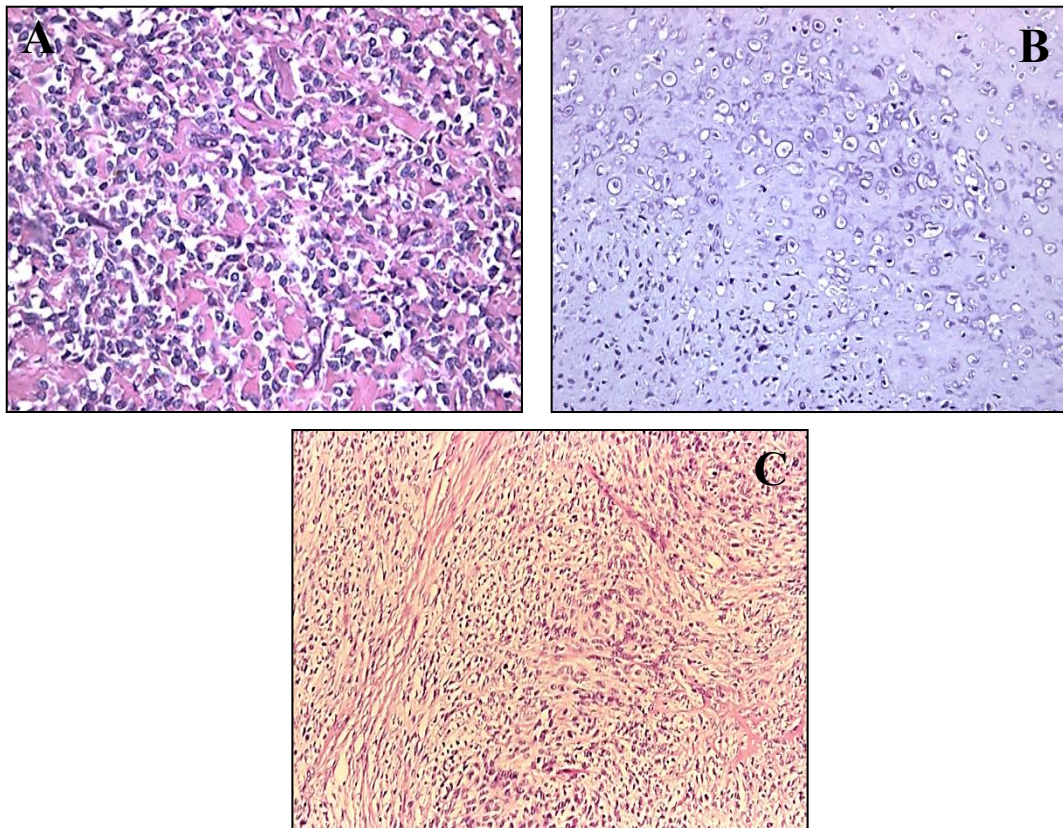


Figura 1. Immagini rappresentative di osteosarcoma convenzionale (OSA) ad elevato grado di malignità. Istotipo osteoblastico (A), condroblastico (B) e fibroblastico (C). Colorazione ematossilina-eosina. Obiettivo 10X.

L'OS è un tumore osseo che può interessare tutti i segmenti ossei, ma in particolare interessa le aree a maggior sviluppo osseo; Infatti lo ritroviamo principalmente a livello delle ossa lunghe, in particolare a livello del femore distale (44%), della tibia prossimale (17%) e dell'omero prossimale (15%).

A livello delle ossa lunghe la porzione che è principalmente interessata è la metafisi ossea (90%), talvolta a livello diafisario (9%), e molto raramente a livello epifisario [11-13].

Nonostante il trattamento multidisciplinare, caratterizzato dall' intervento chirurgico associato a chemioterapia pre- e postoperatoria ed eventualmente anche a radioterapia post operatoria, il tasso di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi rimane sempre molto basso (<20%) [9, 14, 15].

Altre forme di OS, seppur più rare dell'OSA, sono l'OS teleangectasico (OST) e l'Osteosarcoma a piccole cellule (SCO).

L'OST (Figura 2) è stato descritto per la prima volta da J. Paget nel 1853 [16]. Inizialmente considerato come un aneurisma dell'osso, fu J. Ewing che per primo nel 1922 lo descrisse come una delle varianti dell'OS [17-19].

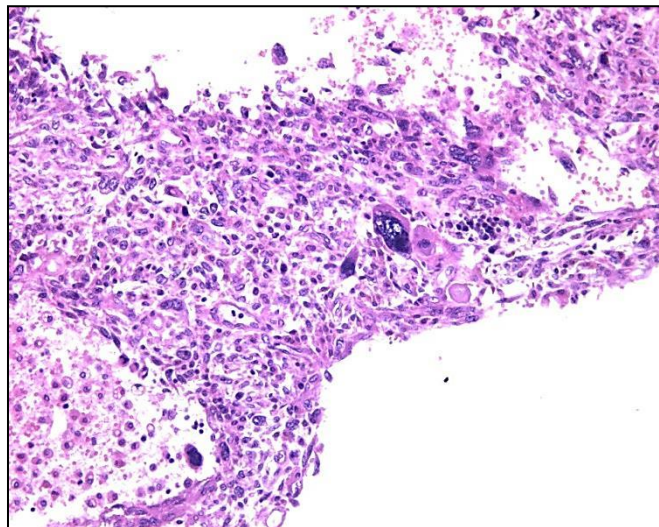


Figura 2. Immagine rappresentativa di osteosarcoma teleangectasico (OST). Ad elevato grado di malignità Colorazione ematossilina-eosina. Obiettivo 10X.

L'OST con un'incidenza del 2-12% di tutti i tumori ossei appendicolari [20, 21], interessa principalmente le aree metafisarie delle ossa lunghe, dove le ossa lunghe ad essere maggiormente interessate sono il femore o la tibia, presentando quindi una distribuzione a livello scheletrico analoga a quella dell'OSA [22]. Altre ossa quali lo sterno, la scapola, le costole, le ossa craniche e la mandibola non sono comunemente coinvolte [23-25].

Da un punto di vista istologico l'OST è ben distinguibile dalle altre forme di OS in quanto presenta cavità all'interno dell'osso, solitamente piene di sangue, separate tra loro da setti che contengono cellule neoplastiche [26, 27], responsabili della produzione della matrice osteoide che ritroviamo nella massa tumorale. Come nel caso dell'OSA anche per la diagnosi dell'OST, l'esame radiografico e quello istologico sono i principali mezzi per diagnosticare questo tumore osseo. Matsuno *et al.* nel 1976 indicarono, infatti, nel loro scritto quali sono le caratteristiche radiografiche e istologiche che caratterizzano questo raro OS [28]. Una di queste è quella di presentarsi come una lesione ossea dove si osservano aree litiche, accanto alle quali si trovano sia cavità contenenti piccole e solide masse tumorali che cavità ricche, invece, di sangue e aree necrotiche. Oltre ad essere una delle forme più aggressive di OS, l'OST rappresenta anche la forma più indifferenziata [29]. Gli studi, infatti, sulla tipologia delle cellule tumorali che lo caratterizzano, hanno messo in luce la presenza di molte cellule indifferenziate. Aspetto completamente opposto alla forma di OSA dove le cellule tumorali si differenziano, come descritto sopra, nelle tre tipologie cellulari (i.e osteoblasti, condroblasti e fibroblasti) che vanno poi a dare il nome al corrispettivo istologico. Sarebbe proprio il suo alto grado di indifferenziazione cellulare che lo renderebbe uno degli OS con la prognosi peggiore. In relazione a questo, infatti, i dati relativi al tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi di OST, mostrano ancora oggi valori estremamente negativi, nonostante sia stato osservato che i pazienti affetti da OST presentano una risposta ai trattamenti chemioterapici migliore dei pazienti con OS convenzionale. L'altra tipologia di OS ad alto grado di malignità è rappresentata dall'OS a piccole cellule (SCO) (Figura 3).

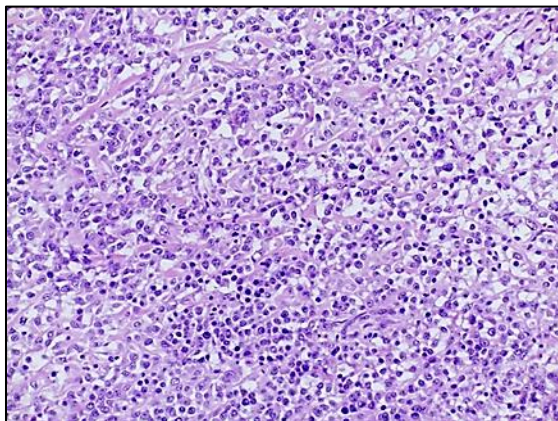


Figura 3. Immagine rappresentativa di osteosarcoma a piccole cellule (SCO) ad elevato grado di malignità istologica. Colorazione ematossilina-eosina. Obiettivo 10X.

Questa forma di OS con un'incidenza dell'1.3% di tutti i casi diagnosticati di OS, è caratterizzata dalla presenza di piccole cellule tumorali rotondeggianti, che occupano a livello osseo aree necrotiche, che sono a loro volta circondate da isolotti di matrice osteoide [30, 31]. In alcuni casi di SCO, è stata inoltre osservata da parte delle cellule tumorali anche la deposizione di matrice condroide [31-34].

Lo SCO può essere, per le piccole cellule che lo caratterizzano, facilmente confuso con un altro tumore primario dell'osso, il Sarcoma di Ewing. Per ovviare a tale errore in immunoistochimica viene valutata la presenza di due marker, il CD99 e il SATB2, tipici del fenotipo osteoblastico e che non sono espressi a livello del Sarcoma di Ewing [36, 37]. L'importanza di fare una corretta diagnosi è in questo caso estremamente importante, in quanto la prognosi dello SCO è subordinata alla giusta terapia. Ad oggi, come nel caso dell'OSA e dell'OST il trattamento è sempre basato sull'associazione di una chemioterapia preoperatoria ad una chirurgia, che deve essere il più possibile ampia o radicale per eliminare la massa tumorale, e ad una chemio- o radioterapia postoperatorie. Nonostante questi aggressivi trattamenti multidisciplinari lo SCO presenta ancora oggi una prognosi peggiore dell'OSA con un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 40%. Inoltre, proprio la scarsa risposta del tumore alla chemioterapia preoperatoria rende gli interventi chirurgici degli interventi demolitivi dell'osso interessato [38,39].

Da quanto sopra descritto per ciascuna delle tre forme di OS ad alto grado di malignità si evince che nonostante gli aggressivi trattamenti multi-terapeutici, l'OS in generale rimane tutt'oggi la seconda causa di morte per cancro nei bambini e nei giovani adulti. I recenti studi sulla biologia dei tumori liquidi, in principio, e successivamente dei tumori solidi hanno portato alla scoperta di una sottopopolazione tumorale che, presente a livello del tumore primario, sarebbe responsabile della resistenza alle terapie e alla formazione di recidive/metastasi nel tempo. Tale popolazione sarebbe dotata di caratteristiche e proprietà analoghe alle cellule staminali adulte e alle cellule embrionali, tanto da essere per questo definite come cellule staminali tumorali (CSCs, *Cancer Stem Cells*) [40-45]. La loro scoperta ha portato quindi ad un crescente interesse da parte del mondo scientifico sulle CSCs in vari tumori, tra cui l'OS, al fine di poterle utilizzare in futuro per lo sviluppo di nuove terapie.

1.2. CELLULE STAMINALI

Era il 1908 quando Alexander Maximov descrisse per la prima volta le cellule staminali (CS) [46,47]. Le CS, presenti durante tutto l'arco della vita di un individuo, grazie al loro potenziale differenziativo, svolgono un ruolo importante non soltanto nello sviluppo dell'embrione a organismo pluricellulare, mediante la formazione di organi e tessuti con funzioni specifiche, ma anche nei fenomeni di rigenerazione/riparazione delle parti lesionate o esaurite in seguito al processo di invecchiamento cellulare. Le CS sono state descritte in diversi organi e tessuti (i.e. il cordone ombelicale, il sacco amniotico, il sangue, il midollo osseo, la placenta, i tessuti adiposi ed altri). Le CS hanno due caratteristiche fondamentali, quali a) la capacità di auto-rinnovarsi, dando origine a nuove CS, e b) il potenziale differenziativo, che permette loro di differenziare in vari tipi cellulari, in risposta ad opportuni stimoli e in determinate condizioni sia fisiologiche sia sperimentali [48-51].

In base a quest'ultima proprietà le CS sono state classificate in:

- Cellule Staminali Totipotenti: CS in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale, dando così origine a tutti i tessuti di un organismo, incluse le cellule germinali. Le CS totipotenti derivano da embrioni costituiti da 4-8 cellule a 3 gg dalla fecondazione;
- Cellule Staminali Pluripotenti: CS capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale, quali l'endoderma, il mesoderma e l'ectoderma, e di dare origine a tutti i tessuti, fuorché alle cellule germinali;
- Cellule Staminali Embrionali Germinali: Sono CS pluripotenti. Derivano dalle cellule germinali primordiali del feto e sono presenti tra la 1^a e la 3^a settimana di sviluppo embrionale e, se isolate, sono in grado di replicarsi illimitatamente, mantenendo capacità differenziative e pluripotenti *in vitro*;

- Cellule Staminali Multipotenti: Le CS multipotenti si trovano nell'individuo adulto ed hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in colture, ma non quella di auto-rinnovarsi in maniera illimitata. Hanno infatti la capacità di non rinnovarsi in maniera illimitata e di differenziarsi soltanto in alcune tipologie cellulari;
- Cellule Staminali Unipotenti: sono le CS presenti nei tessuti adulti, in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare soltanto nel tipo cellulare del tessuto/organo di appartenenza, assicurandone così sia la riparazione che il mantenimento.

Sulla base della loro origine le CS si suddividono in due grandi categorie: le cellule staminali adulte e le cellule staminali embrionali.

1.2.1. CELLULE STAMINALI ADULTE

Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate, localizzate a livello degli organi/tessuti di un organismo adulto, la cui funzione è quella di mantenere l'omeostasi del tessuto/organo di cui fanno parte, e di rigenerare i medesimi in caso di danno/lesione. Sulla base del loro potenziale differenziativo sono CS multipotenti. Questa particolare popolazione cellulare è stata scoperta negli anni '60 quando, a livello del midollo osseo murino, McCulloch e Till scoprirono la presenza di due popolazioni cellulari dotate di caratteristiche staminali quali, le cellule staminali ematopoietiche HSCs (*Haematopoietic Stem Cells*) e le cellule staminali mesenchimali MSCs (*Mesenchymal Stem Cells*) [52].

Le HSCs, sono le cellule progenitrici di tutti gli elementi corpuscolati del sangue [53], mentre le MSCs, dette anche "cellule stromali del midollo osseo" sono le cellule progenitrici di osteociti, condrociti, adipociti, miociti e altre cellule dei tessuti connettivi.

Le MSCs sono cellule che prendono origine dal mesoderma embrionale e sono presenti in numerosi tessuti, quali: a) il tessuto adiposo [54], b) il cervello [55,56], c) il fegato [57], d) il pancreas [58], e) i polmoni [59], f) la prostata [60], g) il rene [61] e anche h) nelle ghiandole mammarie [62]. È stato, inoltre, scoperto che sono presenti, oltre che nel liquido amniotico [63], anche in alcuni annessi embrionali, quali la placenta, il cordone ombelicale e il sangue del cordone ombelicale [64-66]. I primi studi *in vitro* sulle cellule staminali risalgono a quando Friedenstein negli anni '90, iniziando a studiare questa popolazione cellulare, ne mise in evidenza diverse caratteristiche [67-69]. Tra le caratteristiche principali troviamo la capacità di crescita in condizioni di adesione su plastica dando origine ad una popolazione cellulare dall'aspetto fibroblastoide. Popolazione cellulare che non solo è in grado di riprodursi formando colonie cellulari, ma che è anche dotata di una buona capacità proliferativa e differenziativa in altre linee cellulari mesenchimali. Lo studio delle MSCs ha inoltre messo in evidenza nel tempo la presenza di particolari proteine che presenti sulla membrana delle MSCs ne caratterizzano il profilo cellulare, così da essere definite come marcatori delle MSCs. Tra i suddetti marcatori troviamo principalmente: il CD90 (Thy-1), il CD105 (endoglina), il CD29 (subunità β del recettore per la fibronectina), il CD44 (molecola di adesione cellulare), lo STRO-1, il CD166 (ALCAM) e il CD106 (VCAM-1, molecola di adesione per cellule vascolari) [70-75]. Queste sono solo alcune delle proteine che insieme costituiscono il "profilo" delle MSCs. Profilo che è ancora oggi oggetto di studio. Proprio in relazione alle caratteristiche sopraelencate lo studio delle MSCs è ancora oggi uno dei campi più interessanti e promettenti della ricerca biomedica e biotecnologica degli ultimi anni.

1.2.2. CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Le cellule staminali embrionali umane (hESCs, *human Embryonic Stem Cells*) sono state descritte per la prima volta nel 1998, dopo essere state isolate dalle masse cellulari interne di blastocisti umane, donate a scopi di ricerca [76,77]. Queste cellule derivano, in particolare, dalla massa cellulare interna (MCI, in inglese ICM, *inner cell mass*) della blastocisti, allo stadio di sviluppo embrionale che precede l'impianto nella parete dell'utero. La blastocisti è costituita da una sfera suddivisibile in a) una parte chiamata trofoblasto, che costituisce lo strato esterno, b) una porzione interna cava e riempita di fluido, chiamata blastocele, e c) in una terza parte detta MCI, dalla quale vengono, appunto, comunemente isolate le hESCs. Le hESCs sono un gruppo di cellule pluripotenti, dotate della capacità di differenziare indistintamente in tutti e tre i foglietti embrionali. Ecco che quindi la blastocisti assume, un ruolo fondamentale nel campo della ricerca delle cellule staminali embrionali (ESCs, *Embryonic Stem Cells*) e della medicina rigenerativa, alla quale lo studio delle cellule staminali è maggiormente rivolto. Le hESCs, se coltivate *in vitro* in presenza di fibroblasti, citochine e LIF (*leukemia inhibitory factor*) (78), possono moltiplicarsi sino a formare delle colonie di cellule ESCs, le quali, se mantenute in condizioni ottimali, continuano a proliferare rimanendo indifferenziate ed in uno stato diploide. Se invece le condizioni di coltura vengono ad essere alterate, le ESCs iniziano a differenziarsi spontaneamente. La straordinaria capacità proliferativa di cui sono dotate le ESCs rappresenta tuttavia un problema di non facile soluzione, in quanto queste cellule *in vivo* possono o generare dei particolari tumori definiti teratomi, caratterizzati da un insieme di diversi tessuti, oppure possono differenziarsi in tipi cellulari non desiderati. Al contrario invece, *in vitro* è possibile dirigere la loro differenziazione verso un fenotipo cellulare specifico.

Le ESCs rappresenterebbero quindi un ottimo modello cellulare per lo studio *in vitro* di tutti i meccanismi che regolano lo sviluppo embrionale, la differenziazione tissutale e la patogenesi di numerose malattie, oltre che risultare utili nella scoperta di nuovi farmaci; tuttavia, poiché non è ancora chiaro il rischio di tumorigenicità indotto dal trapianto di tali cellule e soprattutto poiché il processo di estrazione di queste cellule necessita della distruzione dell'embrione, in Italia, come in molti altri Paesi, motivi di ordine etico e legislativo (Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13) impediscono la sperimentazione su embrioni umani. Per questo motivo la ricerca punta alla scoperta di una sorgente alternativa di cellule staminali, come ad esempio le cellule staminali isolate da tessuto adulto, le MSCs.

1.2.3. CELLULE STAMINALI TUMORALI

Come sopra descritto tessuti e organi sani presentano una popolazione cellulare eterogenea, caratterizzata non solo da cellule a diversi stadi di sviluppo, ma anche da cellule staminali adulte, le MSCs (*Mesenchymal Stem Cells*). Queste ultime sono le responsabili del mantenimento dell'omeostasi degli organi e dei tessuti di cui fanno parte. Analogamente ai tessuti sani i tumori sono costituiti da una popolazione cellulare eterogenea, caratterizzata non solo da cellule a diverso grado di proliferazione, ma anche da cellule con diverso potenziale tumorigenico. Inoltre, all'interno della massa tumorale, come nei tessuti sani si troverebbe un compartimento caratterizzato dalla presenza di una particolare popolazione cellulare, definita come cellule staminali tumorali (CSCs, *Cancer Stem Cells*) [79]. Le CSCs, come le MSCs per i tessuti e organi sani, costituiscono una riserva di cellule che, dotate di capacità di autorinnovamento non solo mantengono il potenziale tumorigenico dei tumori, ma ne mantengono anche l'omeostasi.

Le CSCs sono state identificate per la prima volta negli anni '90 nella Leucemia Mieloide Acuta e da quel momento sono state studiate ed isolate da un grande numero anche di tumori solidi, diventando così uno dei principali argomenti della ricerca oncologica [80-82]. Studi sulla loro origine hanno ipotizzato che potrebbero originare da cellule staminali adulte, che in seguito ad alterazioni genetiche sviluppano un fenotipo tumorale.

Nonostante le numerose ipotesi sull'origine delle CSCs, ancora oggi la loro origine resta ignota e pertanto rimane oggetto di numerosi studi [83-86].

Una delle caratteristiche particolari delle CSCs è quella di resistere alle terapie, come mostrato da recenti studi che hanno messo in luce come le CSCs presentino un'over-espressione di proteine ABC (dall'inglese ATP-binding cassette).

Proteine che svolgono il ruolo di trasportatori di membrana di un gran numero di sostanze, tra cui gli agenti chemioterapici.

Inoltre presenterebbero anche alti livelli dell'enzima Aldeide Deidrogenasi 1 (ALDH1), conosciuto essere uno degli enzimi che metabolizzano i chemioterapici [87-90]. Altro sistema attraverso il quale resisterebbero alle terapie sarebbe la capacità di autoregolare la cinetica del proprio ciclo cellulare, rimanendo quiescenti fino ad opportune stimolazione.

Ecco perché le terapie antitumorali sarebbero efficaci solo se viene ad essere eradicata la sottopopolazione delle CSCs.

La scoperta delle CSCs all'interno dei sarcomi ossei, rappresenterebbe la possibile spiegazione a come mai i trattamenti multidisciplinari sembrerebbero avere inizialmente degli effetti, che poi scomparirebbero nel tempo con la comparsa di recidive e/o addirittura di metastasi [91,92]. Pertanto risulta essere chiaro che una delle principali speranze per il futuro per i pazienti affetti da questi tumori, risiede nello studio delle CSCs per individuare eventuali target molecolari da utilizzare nello sviluppo di terapie più efficaci e mirate all'eradicazione di tale sottopopolazione cellulare.

2. SCOPO DELLA TESI

L'osteosarcoma (OS) è il tumore primitivo osseo più diffuso in età pediatrica e giovane adulta. Delle diverse tipologie di OS, l'OS convenzionale (OSA), l'OS teleangectasico (OST) e l'OS a piccole cellule (SCO) sono le forme a più alto grado di malignità. Ad oggi, nonostante gli aggressivi trattamenti multi-terapeutici, messi in atto contro questi tumori, e caratterizzati da una chemioterapia preoperatoria, per ridurre le dimensioni del tumore e bloccarne la proliferazione, dall'asportazione chirurgica della massa tumorale e da una chemio- e/o radioterapia postoperatoria, la prognosi a 5 anni dalla diagnosi rimane inferiore al 70%. Questa è la ragione per cui ancora oggi l'OS è considerato la seconda causa di morte per cancro nei bambini e negli adolescenti.

Alla base della riscontrata inefficacia dei suddetti trattamenti si suppone esservi la presenza, all'interno della massa tumorale primaria, delle cosiddette cellule staminali tumorali (CSCs, *Cancer Stem Cells*). Queste, non solo sarebbero in grado di resistere ai trattamenti antineoplastici, ma sarebbero anche in grado di dare recidive e metastasi nel tempo.

Alla luce di quanto descritto lo studio della biologia e della fisiologia di questa particolare popolazione cellulare risulta essere oggi fondamentale per poter individuare dei target molecolari per lo sviluppo di terapie mirate all'eradicazione di tale popolazione. Terapie che dovrebbero per questo risultare più efficaci contro gli OS e in particolare contro le forme ad alto grado di malignità.

Lo studio qui presentato ha non solo lo scopo di mostrare la presenza delle CSCs in campioni umani di OS ad alto grado di malignità, mediante il saggio della crescita in non adesione, ma anche di illustrare la caratterizzazione delle linee cellulari isolate come effettive CSCs da osteosarcoma (OS-CSCs, *Osteosarcoma Cancer Stem Cells*). Lo studio ha preso in esame diverse tipologie di OS, in particolare le tipologie ad alto grado di malignità, dalle quali, dopo l'allestimento delle colture cellulari primarie, si è proceduto all'isolamento e allo studio *in vitro* delle CSCs isolate, con lo scopo di caratterizzarle completamente. Tale caratterizzazione ha previsto lo studio *in vitro* sia del fenotipo staminale mesenchimale che del fenotipo staminale embrionale, in quanto entrambi caratterizzano le CSCs. Questo è l'aspetto che rende le CSCs uniche e diverse dalle altre popolazioni di cellule staminali.

3. MATERIALI E METODI

Lo studio presentato è stato condotto in seguito ad approvazione del Comitato Etico locale (Rif. N. 141/12).

3.1. COLTURE CELLULARI

3.1.1. COLTURE PRIMARIE E LINEE CELLULARI FINITE DI OSTEOSARCOMA

Le colture primarie umane di osteosarcoma (OS) sono state preparate a partire da campioni biotipici di OS ottenuti da 14 pazienti sottoposti a biopsia ossea presso “l’Unità di Ortopedia Oncologica e Ricostruttiva”, AOUC, Firenze, previa firma del consenso informato, in accordo con il protocollo di studio approvato dal Comitato Etico locale per studi umani. La biopsia ossea dei tumori dell’osso può essere eseguita secondo due metodiche quali, l’ago biopsia, che consiste nel prelievo di una parte del tumore osseo mediante la tecnica dell’ago aspirato (Figura 4), e la biopsia ossea definita “a cielo aperto”, che consiste, invece, nella resezione e asportazione chirurgica di una piccola

parte del tumore.

Le biopsie di tessuto tumorale prelevate in sala operatoria sono state immediatamente poste in terreno di McCoy 5A addizionato con HEPES 22 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), penicillina 100 IU/ml e streptomycin 100 µg/ml (LONZA), a pH 7.4, trasportate in laboratorio e processate entro 1 ora. Per isolare le cellule di OS dal tessuto biotipico, questo deve essere disgregato meccanicamente, ovvero deve essere tagliato finemente, fino ad ottenere dei frammenti di ~ 1mm.

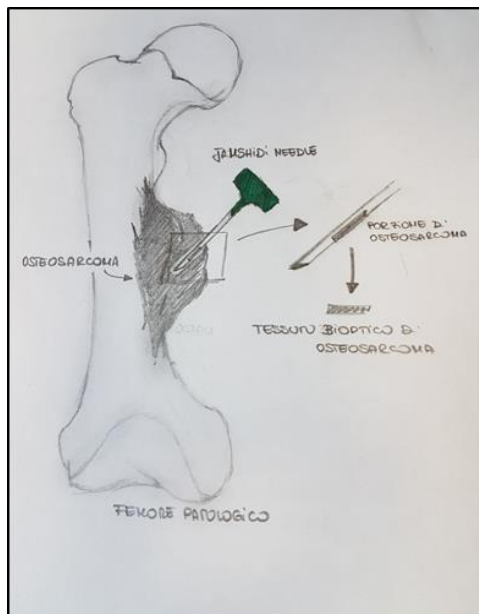


Figura 4. Metodica dell’ago aspirato

Pertanto il tessuto biotico è stato posto in piastra Petri da 10 mm di diametro con un piccolo volume di terreno di crescita (GM, *Growth Medium*) così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 1% di antibiotici (penicillina 100 IU/ml e streptomina 100 µg/ml (LONZA)). Successivamente è stato frammentato mediante pinze e bisturi sterili. I frammenti di tessuto sono stati ricoperti con 10 mL di terreno arricchito in collagenasi, così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) contenente il 20% di siero fetale bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1% di antibiotici (penicillina 100 IU/ml e streptomina 100 µg/ml (LONZA)) e 0.3mg/mL di collagenasi type II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) per la digestione enzimatica.

I frammenti sono stati incubati overnight a 37° C in atmosfere umidificata al 5% di CO₂. Dopo la digestione enzimatica, il contenuto della piastra è stato trasferito in una provetta sterile da 15 ml e centrifugato immediatamente a 400 g x 5 min, facendo precipitare tutti frammenti sul fondo ed eliminando successivamente il soprannatante. Nel caso in cui il tessuto biotico tumorale fosse ricco di eritrociti, dopo l'eliminazione del soprannatante è stata osservata la presenza di un anello di colore rosso sovrastante i frammenti di tessuto sedimentati. Il precipitato è stato risospeso ed incubato in tampone di lisi (NH₄Cl 155mM, K₂HPO₄ 5.7 mM, EDTA 0.1 mM a pH 7.3) a temperatura ambiente (RT) e successivamente centrifugato a 400 g x 2 min, per eliminare la contaminazione da globuli rossi. Lisati gli eritrociti in eccesso e rimosso il soprannatante si è proceduto alla dispersione meccanica in provetta. Il precipitato è stato risospeso 10 – 20 volte pipettando con media vigoria, e centrifugato a 400 g x 5 min, in modo da cercare di liberare le cellule dal tessuto osseo. Una volta rimosso il soprannatante, la frazione cellulare e i frammenti rimasti sono stati seminati in piastra Petri da 10 mm di diametro in GM e coltivati a 37° C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Dopo 3 giorni dalla semina della dispersione cellulare, la piastra è stata lavata per eliminare tutti i detriti e le cellule che non si sono adese.

La coltura cellulare di cellule adese (coltura primaria) è stata fatta proliferare fino alla semi confluenza (~ 3-5 x 10⁵ cellule/piastra), cambiando il terreno ogni 2 volte alla settimana.

Una volta raggiunta la semi confluenza, di solito raggiunta nel giro di 1 mese dalla semina della dispersione cellulare, le colture primarie di OS, sono state subcoltivate andando così a costituire le linee cellulari primarie umane di OS, che sono state siglate come OSA per le linee di OS convenzionale, come OST per l'OS teleangectasico e come SCO per l'OS a piccole cellule.

Le linee cellulari una volta raggiunta la confluenza (80-90%) sono state subcoltivate o criopreservate. Nel primo caso le cellule sono state tripsinizzate mediante una soluzione di Tripsina-EDTA (Soluzione contenente 400 mg di Tripsina, 200 mg di EDTA e 1000 mg di D(+)Glucosio Anidro in 1000 mL di Dulbecco-Buffer Fosfato senza Ca^{2+} e Mg^{2+} (DPBS, *Dulbecco Phosphate Buffered Saline w/o Ca and w/o Mg*)) per 3 min a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore, neutralizzata poi aggiungendovi del GM. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 400 g x 5 min e il precipitato cellulare risospeso in GM e seminato in nuove piastre Petri da 100 mm di diametro.

Nel secondo caso, dopo il primo passaggio, le diverse linee cellulari di OS dopo essere state tripsinizzate, sono state risospese in terreno di congelamento (FM, *Freezing Medium*) così composto: terreno Ham's F12 modificato secondo Coon, addizionato con il 40% di FBS, 1% di antibiotico ((Ab) penicillina 100 IU/ml e streptomycin 100 µg/ml) e 6.5 % di Dimetilsolfossido (DMSO) (BDH Chemicals-VWR). Successivamente sono state criopreservate in azoto (N₂) liquido fino al momento dell'utilizzo. Tutte le manipolazioni che sono state descritte sono state condotte in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare.

3.1.2. SAGGIO DELLE SFERE PER L'ISOLAMENTO DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI DI OSTEOSARCOMA

Il saggio di formazione delle sfere cellulari in 3-dimensione è stato utilizzato per identificare ed isolare le cellule staminali tumorali (CSCs) all'interno delle diverse linee di OS, per ottenere le cellule staminali tumorali di osteosarcoma (OS-CSCs, *Osteosarcoma Cancer Stem Cells*), opportunamente siglate in relazione alla linea primaria da cui sono state isolate. Questo saggio *in vitro* si basa sullo sfruttamento di una caratteristica propria delle CSCs, quella di crescere in tridimensionalità in condizioni di non adesione, formando delle colonie sferiche. Per tale saggio sono state utilizzate cellule di OS tra il primo ed il secondo passaggio.

Una volta raggiunto il 90% della confluenza le cellule di OS sono state tripsinizzate con Tripsina-EDTA a formare una sospensione cellulare, che è stata contata in camera di Bürker per calcolare il volume di sospensione cellulare necessario per seminare 40.000 cellule/pozzetto, per un totale di 240.000 cellule in una piastra da 6 pozzetti a bassissima adesività (Corning Inc., Corning, NY).

Il volume calcolato, necessario all'allestimento del saggio, è stato aggiunto al terreno di crescita delle sfere cellulari (SGM, *Sarcosphere Growth Medium*) così composto: terreno Ham's F12 modificato secondo Coon addizionato con 2% di metilcellulosa, il progesterone (20 nM), putresceina (100 µM), acido selenioso (30 nM), transferrina (25 µg/ml), l'insulina (20 µg/ml), fattore di crescita dell'epidermide (EGF) (10 ng/ml) e fattore di crescita basale dei fibroblasti (b-FGF) (10 ng/ml), come descritto da Gibbs et al. [93]. Tutti i reagenti elencati a composizione del terreno SGM sono stati forniti da Sigma-Aldrich, St.Louis, MO.).

Una volta seminate le cellule sono state coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore. Aliquote fresche di EGF e di b-FGF sono state aggiunte a ciascun pozzetto ogni 3 giorni per tutta la durata del saggio. Dopo 21 o 28 giorni dall'allestimento del saggio, è stata osservata la presenza di colonie sferiche definite "sarcosfere" e costituite da ~ 50-100 cellule.

Al momento della loro rilevazione si è proceduto prima alla loro quantificazione mediante microscopio rovesciato a contrasto di fase e successivamente al loro isolamento mediante l'utilizzo di un particolare sistema di filtrazione per forza gravitazionale costituito da camere filtranti e filtri Swinnex, entrambi sterili (Figura 5) come descritto da Palmini *et al.* [94].

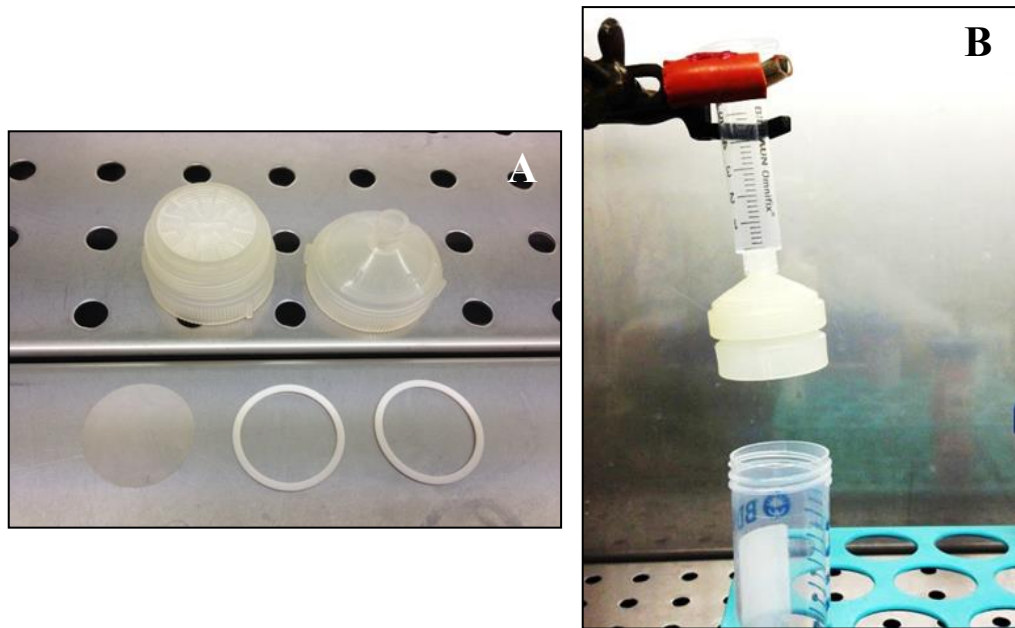


Figura 5. Isolamento delle sarcosfere mediante utilizzo di un unità filtrante (A) montata su apposito supporto (B)

Una volta così recuperate, le sarcosfere sono state seminate in condizioni normali di adesione in piastre Petri da 60 mm di diametro in GM e coltivate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore. Tutte le linee cellulari primarie di OS sono state sottoposte al saggio delle sarcosfere per l'isolamento delle cellule staminali tumorali. Anche le linee cellulari ottenute dalle sarcosfere sono state sottoposte nuovamente a tale saggio come valutazione del fenotipo staminale tumorale che si suppone possano avere. In questo caso la seconda generazione di sfere cellulari ha dato origine a linee cellulari che sono state siglate a seconda della linea di CSCs testate come OSA-CSCs-II, OST-CSCs-II e SCO-CSCs-II, sulla base delle varie tipologie di OS.

3.1.3. COLTURE DI CELLULE STAMINALI TUMORALI DI OSTEOSARCOMA

Le linee cellulari ottenute mediante il saggio delle sarcosfere, le OS-CSCs, opportunamente siglate a seconda delle diverse tipologie di OS (i.e. OSA-CSC, dove la sigla OSA è seguita da un numero d'ordine progressivo per ciascuna linea di OS convenzionale, OST-CSCs e SCO-CSCs), sono state coltivate in terreno di crescita specifico (CSCs-GM, *Cancer Stem Cells Growth Medium*) così costituito: Ham's F12 modificato secondo Coon contenente il 10% di FBS, 1% di antibiotici (penicillina 100 IU/mL e streptomina 100 µg/mL) e b-FGF (1 nmol/L). Le colture cellulari di OS-CSCs sono state fatte proliferare fino alla confluenza, cambiando il terreno 2 volte a settimana. Al raggiungimento della confluenza le colture di OS-CSCs sono state subcoltivate. Successivamente, al primo passaggio le cellule di OS-CSCs sono state congelate (vedi sopra) e criopreservate in azoto (N₂) liquido e utilizzate per studi *in vitro* di caratterizzazione del loro fenotipo staminale-tumorale.

3.2.ANALISI *IN VITRO* PER LA CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI TUMORALI

La valutazione del fenotipo staminale tumorale di ciascuna delle OS-CSCs ottenute come sopradescritto, ha previsto l'esecuzione di diverse analisi *in vitro* di biologia cellulare e molecolare, quali:

- la valutazione del tempo di crescita della popolazione cellulare;
- il saggio delle Unità Formanti Colonie (CFU, *Colony Forming Unit*);
- il saggio di crescita in agar soft;
- il saggio di crescita in non adesione (saggio delle sarcosfere) (descritto nella sezione precedente);
- la valutazione della capacità differenziativa verso il fenotipo osteoblastico e il fenotipo adipogenico;
- il saggio di valutazione dell'attività enzimatica della Aldeide Deidrogenasi (ALDH);
- la valutazione in immunofluorescenza e in citofluorimetria della presenza/assenza di marcatori specifici delle cellule staminali mesenchimali (MSCs) e delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs);
- la valutazione in immunofluorescenza della presenza/assenza dei marcatori specifici delle cellule staminali embrionali (ESCs);
- la valutazione in immunofluorescenza della presenza/assenza dei marcatori di superficie specifici per le cellule staminali tumorali (CSCs);
- analisi dell'espressione genica in Real Time PCR (RT-PCR) dei geni caratteristici sia del fenotipo staminale embrionale sia del fenotipo tumorale;

3.2.1 TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE

3.2.1.1 ANALISI DELLA CRESCITA DELLE OS-CSCs:

Le cellule delle linee di OS-CSCs, una volta raggiunto il 70-80 % di confluenza sono state staccate con tripsina. La sospensione cellulare ottenuta è stata contata in camera di Bürker e, successivamente, le cellule sono state seminate alla concentrazione di 10×10^3 cellule/piastra in piastre Petri da 100 mm di diametro, coltivate in CSC-GM e incubate a 37°C, in atmosfera umidificata 5% di CO₂ in incubatore per 24 ore. Dopo 24 ore è stata effettuata la prima conta (Tempo 0 ore) mediante camera di Bürker. La crescita cellulare è stata valutata a 0, 2, 4, 6 e 8 giorni. I dati delle singole conte sono stati elaborati ottenendo le relative regressioni lineari in Excell (Microsoft, Redmond, WA, USA) da cui è stato possibile calcolare il tempo di duplicazione per ciascuna popolazione cellulare. Tempo di duplicazione che rappresenta l'intervallo di tempo impiegato da una popolazione cellulare per raddoppiarsi durante la fase logaritmica di crescita. Ciascuna conta cellulare è stata realizzata in triplicato.

3.2.1.2 SAGGIO DELLE UNITÁ FORMANTI COLONIE

L'acronimo CFU (*Colony Forming Unit*, in italiano Unità Formanti Colonie) utilizzato per indicare tale saggio, è un termine utilizzato principalmente in microbiologia e micologia, per descrivere la formazione di una colonia originata da una singola cellula, batterica o fungina. Lo stesso concetto è applicabile allo studio delle cellule degli organismi superiori, ovviamente con le dovute considerazioni sulla base delle differenze presenti tra cellule eucariote e procariote. Nello specifico caso dell'essere umano lo studio delle CFU è applicato soprattutto alle cellule staminali della linea ematopoietica (HSCs, *Hematopoietic Stem Cells*). Le HSCs sono, infatti, in grado di formare colonie diverse, in base al tipo di linea cellulare e al rispettivo progenitore.

Si parla, ad esempio, di: CFU-L (*Colony Forming Unit Lymphocyte*, colonie linfocitarie), CFU-E (*Colony Forming Unit Erythrocyte*, colonie eritrocitarie), CFU-GM (*Colony Forming Unit Granulo-Monocyte*, colonie granulo-monocitarie), CFU-Me (*Colony Forming Unit Megakariocyte*, colonie megacariocitarie).

E' stato anche osservato che le cellule staminali mesenchimali (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*) sono potenzialmente in grado di dare origine a tali colonie. Queste, caratterizzate da cellule di forma stretta e allungata, vicine tra loro, ricordando i fibroblasti sono state definite CFU-F (*Colony Forming Units Fibroblast*, colonie simil-fibroblastoidi). In relazione a tutto questo la capacità delle MSCs di dare origine ad una colonia a partire da una singola cellulare è indice della loro capacità clonogenica e di autorinnovamento, caratteristica fondamentale, anche se non esclusiva, della cellula staminale. Pertanto, l'allestimento di tale saggio permette di valutare, insieme alle altre analisi, il caratteristico fenotipo staminale mesenchimale che caratterizza le CSCs.

3.2.1.2.1 ALLESTIMENTO DEL SAGGIO

Una volta che le OS-CSCs abbiano raggiunto l'80% di confluenza, sono state tripsinizzate con tripsina e la sospensione cellulare ottenuta dopo esser stata contata con camera di Bürker è stata seminata in piastre Petri da 100 mm di diametro ad una densità di 450 cellule/piastra. Le cellule sono state coltivate in specifico terreno di crescita (CFU-GM, *Colony Forming Unit Growth Medium*) così formato: Ham's F12 modificato secondo Coon, addizionato con il 20 % di FBS e l'1% di Ab. Le linee cellulari così trattate sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore per un tempo variabile dalle 3 alle 4 settimane circa, senza stabilire un tempo preciso, in modo da dare la possibilità a tutte le linee cellulari testate di formare colonie (se capaci), dando comunque come tempo limite le 4 settimane. L'esperimento è stato condotto in triplicato. Il CFU-GM è stato cambiato una volta a settimana. L'andamento del saggio è stato valutato ogni 2 giorni mediante osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase, fino all'effettiva comparsa di colonie cellulari formate da più di 50 cellule.

A questo punto le piastre, dopo essere state lavate con DPBS, sono state sottoposte a trattamento fissativo con Formaldeide al 4% per 10 minuti. Successivamente la Formaldeide è stata eliminata mediante lavaggi con H₂O ultrapura e le colonie fissate sono state colorate aggiungendo per 10 min blu di toluidina 0,1% in H₂O e poi lavate con H₂O ultrapura per eliminare eventuali eccessi di colorante. Talvolta, nel caso di colorazione non sufficiente, il blu di toluidina può essere aggiunto nuovamente per altri 10 minuti.

Le colonie cellulari visibili grazie alla colorazione sono state contate al microscopio ottico in campo chiaro e sono state prese in considerazione solo le colonie formate da un minimo di 50 cellule. Infine, i dati ottenuti dalle conte sono stati confrontati con il numero di cellule seminate per piastra, secondo la seguente formula (N° colonie formate/ N° cellule seminate in piastra) x 100, ottenendo così la percentuale di CFU, definita anche “*plating efficiency*”.

3.2.1.3 AGAR SOFT

Il saggio della crescita in agar si basa sulla capacità delle cellule tumorali di crescere *in vitro* in condizioni ancoraggio indipendenti formando colonie in una matrice semisolida. Scopo di tale saggio è quello di valutare il potenziale tumorigenico delle cellule oggetto dello studio. Il saggio è stato allestito su ciascuna delle linee primarie di OS, per ciascuna delle linee di OS-CSCs isolate da ciascuna di esse, sulla linea commerciale continua di cellule di osteosarcoma, SaOS-2, acquistata da America Type Culture (ATCC, Manassas,), utilizzata come controllo positivo, e su di una linea di cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo, siglate come PA41. Per il saggio sono state utilizzate piastre da 6 pozzetti e per ciascuna linea il saggio è stato allestito in triplicato.

3.2.1.3.1 ALLESTIMENTO DEL SAGGIO

Per prima cosa ciascun pozzetto della piastra è stato rivestito con 2 ml di una soluzione di agarosio all'1% in terreno Ham's F12 modificato secondo Coon senza siero e immediatamente posto a gelificare a 4°C, formando così il cosiddetto *bottom layer*.

Una volta solidificato il *bottom layer* si è proceduto con la tripsinizzazione del monostrato cellulare, alla sua dispersione formando una sospensione cellulare che è stata diluita per arrivare alla concentrazione cellulare 2X e mantenuta a 37°C.

Contemporaneamente è stata preparata in terreno di crescita Ham's F12 modificato secondo Coon addizionato con il 40% di FBS, penicillina 100 IU/mL e streptomina 100 µg/mL, una soluzione allo 0,33% di agarosio e mantenuta a 45°C in bagnetto termostato.

La sospensione cellulare è stata mescolata ad un volume uguale della soluzione allo 0,66% di agarosio, velocemente distribuita in ciascun pozzetto alla concentrazione finale di $2,5 \times 10^3$ cellule/pozzetto. La piastra è stata immediatamente posta a 4°C per far solidificare lo strato superiore (*top layer*) contenente la sospensione cellulare. Una volta ben gelificato anche il *top layer* le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Il saggio è stato monitorato mediante osservazione a microscopio ottico a contrasto di fase per 4 settimane, durante le quali il *top layer* è stato almeno una volta a settimana integrato con terreno fresco, per garantire il corretto grado di umidità. Dopo 4 settimane le colonie che si sono formate in agar sono state contate al microscopio a contrasto di fase (Axiovert 200M, ZEISS). Il saggio è stato allestito in triplicato per ciascuna linea cellulare presa in esame.

3.2.1.4 DIFFERENZIAZIONE OSTEOGENICA

Le cellule delle linee di OSA-CSCs sono state piastrate su piastre da 24 pozzetti alla densità di 1×10^4 cellule/cm² in GM e incubate a 37°, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Una volta raggiunta la quasi confluenza (80 – 90%) in ciascun pozzetto, il GM è stato sostituito dall'apposito terreno di differenziamento osteogenico (OM, *Osteogenic Medium*) così composto Ham's F12 modificato secondo Coon, pH 7.4, addizionato con 10% di FBS, 1% di Ab (100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), 10 nM dexametasone, 0.2 mM di 2-fosfo-L-ascorbato di sodio, and 10 mM β-glicerofosfato). Il terreno è stato cambiato ogni 3-4 giorni. La differenziazione osteogenica è stata bloccata a tempi diversi di induzione (da 0 a 21 giorni) per analizzare il fenotipo osteoblastico. Quest'ultimo è stato analizzato a tempi diversi dell'induzione mediante la determinazione contemporanea dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP) (colorazione citochimica e dosaggio fluorimetrico dell'ALP) e della mineralizzazione (colorazione citochimica e dosaggio fluorimetrico dei depositi di idrossiapatite (HA)). Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich, St.Louis, MO.

3.2.1.4.1 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLA FOSFATASI ALCALINA

3.2.1.4.1.1 COLORAZIONE CITOCHIMICA DELLA FOSFATASI ALCALINA

Per la colorazione della fosfatasi alcalina (ALP), le cellule sono state coltivate in OM in piastre da 24 pozzetti. Le cellule sono state lavate 2-3 volte con DPBS, per eliminare eventuali cellule non adese e detriti, e poi fissate in Formaldeide al 4% in DPBS per 5-6 min. La Formaldeide è stata rimossa e attraverso una serie di lavaggi con H₂O ultrapura. Le cellule così fissate sono state marcate con una miscela colorante composta da 5 mg di Naftolo-AS-MX fosfato (precedentemente solubilizzato in 1 ml di DMSO), 40 mg di sale Fast Blue BB, e 49 ml di terreno di coltura a pH 8.9 (soluzione preparata al momento dell'uso), per 30 minuti a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore. Infine i campioni sono stati abbondantemente lavati con acqua ultrapura ed osservati al microscopio, valutando l'intensità della colorazione e ricolorando se risultava insufficiente. I campioni sono stati osservati in campo chiaro con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) e le immagini acquisite con telecamera AxioCam HRC 12 Mpixel e software AxioVision.

3.2.1.4.1.2 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DELLA FOSFATASI ALCALINA SUL SOPRANATANTE DI CELLULE IN CULTURA

Il dosaggio si basa sul principio che la ALP presente nelle cellule reagisca con un substrato, il 4-metil-umbelliferil-fosfato (4-MUP) rompendo il legame estereo e liberando un prodotto altamente fluorescente. Le cellule in coltura, sono state seminate e coltivate in piastre da 24 pozzetti in OM fino al termine del saggio, e successivamente fissate in formaldeide al 4%; al momento del dosaggio ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 500 μL di tampone d'incubazione Tris-HCl pH 8.9 contenente 0.5 mM per 5 minuti. Dopo l'incubazione sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 1500 μL di NaOH 0.1 N per fermare la reazione, e il sopranatante è stato trasferito in una piastra nuova da 24 pozzetti., per la successiva lettura insieme alla curva standard. La curva standard di 4-MU, nell'intervallo di concentrazioni finali 250 μM – 50 nM, è stata preparata a partire dalla soluzione stock 10 mM con diluizioni seriate in tampone d'incubazione. Per ogni punto, 500 μl della curva standard sono stati trasferiti in pozzetto di piastra da 24 pozzetti, preparando un triplicato per ogni punto. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 1500 μL di NaOH 0.1N. La lettura in piastra della curva standard e dei campioni è stata effettuata con spettrofluorimetro LS55 con lettore in piastre (PerkinElmer), con lunghezza d'onda (λ) di eccitazione di 365 nm, e con λ di emissione di 445 nm, regolando l'ampiezza degli slit di emissione e di eccitazione secondo le esigenze, in modo da rimanere all'interno del range di lettura dello strumento. I dati ottenuti sono stati riportati su di un foglio Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) per le successive elaborazioni.

3.2.1.4.2 VALUTAZIONE DELLA FORMAZIONE DEI DEPOSITI DI IDROSSIAPATITE

3.2.1.4.2.1 COLORAZIONE ISTOCHEMICA DEI DEPOSITI DI HA

Le cellule sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti in OM e successivamente fissate in formaldeide al 4% in DPBS per 5-6 minuti. Sono state ricoperte con una soluzione contenente Alizarina Red S 2% (58 mM) in H₂O ultrapura a pH 6.0 (ottenuta con aggiunta di NH₃ 2,5% goccia a goccia), lasciandole incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (RT) e risciacquate con acqua di fonte. Successivamente, è stato valutato al microscopio il livello di colorazione dei depositi (la colorazione viene ripetuta se ritenuta insufficiente). I campioni sono stati osservati in campo chiaro con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) e le immagini acquisite con telecamera AxioCam HRC 12 Mpixel e software AxioVision.

3.2.1.4.2.2 DOSAGGIO FLUORIMETRICO DEI DEPOSITI DI HA

La soluzione fluorescente standard di HA è stata preparata pesando 10 mg di HA e aggiungendovi 5 mL di calceina (un chelante fluorescente del calcio) 100 µg/mL e trasferendo il tutto in provetta. La soluzione è stata agitata e incubata per 60 min a RT. La calceina non chelata all'HA è stata, quindi eliminata mediante 3-4 lavaggi con H₂O ultrapura e successive centrifugazioni a 2000 xg per 5 min. Al pellet HA-calceina così ottenuto sono stati poi aggiunti, 10 mL di NaEDTA 50 mM. La provetta dopo essere stata agitata è stata incubata a RT, fino alla completa solubilizzazione dei depositi di HA. La soluzione standard che si ottiene, corrispondente a 1 mg/mL di HA, può essere conservata a +4°C al buio fino al momento della preparazione della curva standard per il dosaggio. Le linee cellulari, sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti in OM contenente calceina 1 µg/mL per il tempo del saggio che va da 0 a 21 gg. Le cellule dopo essere state lavate un paio di volte con DPBS, per eliminare la calceina in soluzione ed eventuali detriti, sono state fissate in formaldeide al 4% in DPBS per 5-6 minuti e risciacquate 2-3 volte con H₂O ultrapura.

I campioni sono stati conservati a + 4°C fino al momento del dosaggio dell'HA. Al momento del dosaggio i campioni fissati sono stati incubati con 2 mL di NaEDTA 50 mM al buio a RT overnight. Il giorno successivo, verificata la solubilizzazione completa dei depositi di HA, si è proceduto alla lettura dei campioni in cuvetta in spettrofluorimetro LS55 (Perkin Elmer) a λ di eccitazione di 494 nm e λ di emissione di 517 nm insieme ad una curva standard di HA nell'intervallo di concentrazioni di 25 ng/mL – 2000 μ g/mL, e preparata al momento della lettura dei campioni diluendo la soluzione stock di HA 1 mg/mL (descritta precedentemente) con NaEDTA 50 mM. Per la lettura gli slit di eccitazione e di emissione sono stati regolati in modo che i valori rientrassero nel range di lettura dello strumento, anche per i campioni più concentrati. I dati ottenuti sono stati riportati su di un foglio Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) per le successive elaborazioni.

3.2.1.5 DIFFERENZIAZIONE ADIPOGENICA

Le cellule delle linee di OS-CSCs sono state piastrate su piastre da 24 pozzetti alla densità di 1×10^4 cellule/cm² in GM e incubate a 37°, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Una volta raggiunta la quasi confluenza (80 – 90%), in ciascun pozzetto il GM è stato sostituito dall'apposito terreno di differenziamento adipogenico (AM, *Adipogenic Medium*) così composto: Ham's F12 modificato secondo Coon, pH 7.4, addizionato con FBS 10%, penicillina 100 IU/ml, streptomina 100 µg/ml, dexametasone 1 µM, insulina bovina 10 µM, IBMX (Isobutilmetilxantina) 0,5 mM. Il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni. Le cellule sono state mantenute in coltura in AM per 30 gg. L'espressione del fenotipo adipogenico è stata valutata mediante colorazione delle vescicole adipose con una miscela colorante preparata al momento (soluzione satura Oil Red O in Isopropanolo : H₂O ultrapura = 6:4) e contro colorazione nucleare con Emallume dopo fissazione in Formaldeide 4% in DPBS per 5-6 min. Come controllo negativo sono state valutate, con gli stessi parametri, cellule della linea OS-CSCs testata non indotte. I campioni sono stati osservati in campo chiaro con un microscopio Axiovert 200M (Zeiss) e le immagini acquisite con telecamera AxioCam HRC 12 Mpixel e software AxioVision. Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

3.2.1.6 SAGGIO DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA DELL'ALDEIDE DEIDROGENASI

Le Aldeide Deidrogenasi (ALDH) sono una famiglia di enzimi che catalizzano diverse reazioni e hanno il ruolo di prevenire l'accumulo di aldeidi e dei loro metaboliti, in quanto specie reattive e potenzialmente tossiche. Oltre a svolgere questo ruolo, le ALDH sono enzimi coinvolti anche in diversi processi cellulari quali, la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza cellulari. Ultimamente è stato osservato che l'aumento dell'attività della Aldeide Deidrogenasi 1 A1 (ALDH1A1, *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1*) è presente nelle CSCs, rappresentando così un marcatore per le popolazioni di CSCs all'interno dell'eterogenea popolazione tumorale.

3.2.1.6.1 ALLESTIMENTO DEL DOSAGGIO ENZIMATICO

Il saggio dell'attività enzimatica dell'ALDH1A1 è stato valutato utilizzando il kit colorimetrico fornito da Sigma-Aldrich, t. Louis, MO, sulle linee di OS-CSCs e su di una linea cellulare finita di fibroblasti, utilizzata come controllo negativo, siglata come FIB6. Il kit permette di quantificare l'attività dell'ALDH1A1 mediante lettura dell'assorbanza dei campioni a λ di 450 nm utilizzando un lettore di piastre (VICTOR, Perkin Elmer).

Le cellule sono state coltivate in piastre Petri da 100 mm di diametro in GM fino al raggiungimento della confluenza. Successivamente sono state tripsinizzate e la sospensione cellulare è stata trattata come riportato nel protocollo. Tutti dosaggi sono stati fatti in triplicato.

3.2.1.7 COLORAZIONI IN IMMUNOFLUORESCENZA

I saggi di immunofluorescenza sono stati realizzati per valutare il fenotipo delle CSCs andando a valutare la presenza sia dei marcatori di superficie propri delle cellule staminali mesenchimali MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*), utilizzando gli anticorpi primari verso il CD44, CD45, CD105 e Stro- 1, e dei marcatori intracellulari propri delle cellule staminali embrionali (ESCs, *Embryonic Stem Cells*), utilizzando gli anticorpi primari verso Nanog, POU5F1, Sox2 e KLF4. Infine è stata valutata anche la presenza di CD133 (o PROM1) e di CD117, due marcatori delle CSCs in generale.

3.2.1.7.1 METODICA

Per le varie colorazioni in immunofluorescenza le cellule delle linee OSA-CSCs sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti, in cui vi sono state seminate a partire da una piastra Petri di 100 mm di diametro giunta a confluenza.

Dopo un tempo variabile in base alla quantità di cellule presenti nei singoli pozzetti (non deve essere raggiunta la confluenza in modo da avere anche gruppi di cellule più isolati), le cellule sono state lavate 3 volte con DPBS anche non sterile, ed in seguito fissate con 1 ml a pozzetto di formaldeide 4% in DPBS per 10 minuti. L'operazione di distribuzione della formaldeide deve essere più rapida possibile al fine di evitare che il pozzetto vada a secco, in quanto in questo caso le cellule subirebbero dei danni tali da inficiare la qualità del campione per le successive colorazioni. Infine, i campioni sono stati lavati 3 volte con H₂O ultrapura e lasciati asciugare. I lavaggi iniziali con PBS hanno lo scopo di rimuovere eventuali cellule non adese o detriti cellulari, che potrebbero altrimenti restare all'interno del pozzetto e venire fissati; inoltre il PBS serve a mantenere l'osmolarità delle cellule (intorno a 300 mOsm), poiché in questa fase le cellule sono ancora vive e non fissate, quindi soggette ai cambiamenti di osmolarità del medium. Le piastre sono state conservate a +4°C fino al momento dell'uso.

Al momento della colorazione le cellule sono state lavate 3 volte con DPBS e permeabilizzate con 500 µl/pozzetto di soluzione di TRITON 100X allo 0,2% in DPBS per 30 minuti a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore. Successivamente, dopo una serie di 3 lavaggi con DPBS sono stati aggiunti 100 µl di RNAsi diluita 1/1000 in una soluzione di BSA (*Bovine Serum Albumin*, Albumina sierica bovina) al 2% in DPBS (DPBS albuminato).

Il fondo del pozzetto è stato poi ricoperto con un disco di parafilm (facendo così in modo che tutto il campione rimanga coperto dalla soluzione) e i campioni sono stati incubati per 30 minuti a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore. Dopo l'incubazione, i vari pozzetti sono stati lavati 3 volte con DPBS albuminato. Il trattamento con RNAsi è stato eseguito in previsione di una colorazione nucleare con ioduro di propidio, un intercalante fluorescente degli acidi nucleici (DNA e RNA): con la degradazione dell'RNA il colorante nucleare si legherà solo al DNA e non si avrà, in contemporanea, una colorazione diffusa del citoplasma.

L'aggiunta di BSA ha, invece, lo scopo di bloccare i siti aspecifici ai quali gli anticorpi primario e secondario potrebbero legarsi, dando così un segnale aspecifico.

Successivamente, campioni distinti di cellule sono stati incubati separatamente con gli anticorpi primari anti-uomo da topo ((1:5; Anti-CD44 (Invitrogen); 1:5; anti-CD105 (Invitrogen); 1:5 Anti-Stro-1, Invitrogen; 1:10; 1:10 Anti-Prom1 (CD133) (Militeny)) e anti-uomo da coniglio ((1:10; anti-Nanog, (Abcam); 1:10; anti-POU5F1 (Abcam); 1:10; anti Sox2 (Abcam); 1:10, anti-KLF4 (Abcam); 1:10, Anti-CD117 (Bioss)). Per ciascuno degli anticorpi primari elencati ai rispettivi pozzetti sono stati aggiunti 50 µl di anticorpo primario diluito in soluzione di BSA al 2% in DPBS. I campioni sono stati incubati overnight al buio in camera umida a 4°C.

Il giorno seguente, dopo una serie di 3 lavaggi con DPBS e 2 lavaggi con soluzione di BSA al 2% in DPBS, i vari campioni sono stati incubati, rispettivamente, con gli opportuni anticorpi secondari marcati con fluorocromi specifici (1:300; goat anti-Mouse Alexa Fluor 635 IgG (H+L), Life Technologies; 1:300; Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Superclonal Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, Invitrogen).

Come per l'anticorpo primario, anche in questo caso sono stati aggiunti ad ogni campione, compresi i controlli negativi, 50 µl di soluzione di anticorpo secondario, diluito in soluzione di BSA al 2% in PBS più disco di parafilm, con successiva incubazione a RT, al buio per un'ora.

Successivamente sono stati eseguiti diversi lavaggi con DPBS, per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario non legato, due lavaggi con H₂O ultrapura, per rimuovere i sali di DPBS e lasciati asciugare i pozzetti. Infine si è proceduto alla colorazione nucleare con Ioduro di Propidio, aggiungendo per ciascun pozzetto 200 µL di soluzione di Ioduro di Propidio 10⁻⁵ M in DPBS e lasciando incubare per 2-3 min al buio a RT. Successivamente le cellule sono state lavate diverse volte con H₂O ultrapura e lasciate asciugare. Le cellule sono state osservate al microscopio confocale a scansione laser (LSM 5109 Meta, ZEISS), per verificare l'avvenuta colorazione.

Come controllo negativo è stata utilizzata una linea di cellule umane da carcinoma del colon, siglata HCT8, coltivate in terreno RPMI 1640, addizionato con sodio piruvato, 10% di FBS e antibiotici. Gli anticorpi secondari e i coloranti utilizzati sono stati selezionati in modo tale da evitare un'eventuale sovrapposizione dei segnali con l'osservazione in LSCM.

3.2.1.8 ANALISI DELL'IMMUNOFENOTIPO MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

La citofluorimetria a flusso è una metodica che permette di valutare parametri fisici e chimici di particelle biologiche o cellule contenute in una sospensione facendole passare in una camera di rilevazione con un'elevata velocità di analisi. La citofluorimetria a flusso ha diversi vantaggi, quali a) il vantaggio di poter analizzare un alto numero di cellule (chiamate "eventi") in tempi ristretti di acquisizione e, b) consente inoltre la raccolta contemporanea fino a 10 parametri per cellula valutabili singolarmente o in combinazione mediante gating. Il citofluorimetro presenta sorgenti di illuminazione a laser, fotomoltiplicatori o sensori, filtri ottici ed una cella a flusso.

Con l'analisi citofluorimetrica si valutano parametri tra cui il forward scatter (FS), o scatter della luce in avanti, che risulta dalla rifrazione della luce dovuta alla superficie delle particelle, l'impulso ottenuto è proporzionale alle dimensioni della cellula, e il side scatter (SS), o scatter della luce a 90°, deriva invece dalla granulosità della particella ed è quindi proporzionale alla complessità strutturale della cellula. Pertanto permette di avere informazioni anche sulla morfologia delle cellule prese in esame. L'altro aspetto importante è quello relativo alle informazioni che permette di ottenere mediante la marcatura delle cellule. La marcatura si basa infatti sull'immunofluorescenza di fluorocromi coniugati ad anticorpi anti antigene specifico. Può essere fatta una marcatura simultanea di 3, 4 o più anticorpi, legati a diversi fluorocromi con un aumento del numero delle informazioni che si ottengono con una singola lettura del campione in esame. I fluorocromi sono sostanze capaci di assorbire la luce ad una determinata lunghezza d'onda e di emetterla ad una lunghezza d'onda superiore. I più comuni sono: sotiocianato di fluoresceina (FITC), ficoeritrina (PE), alloficocianina (APC), PE-Cy7, peridinina clorofilla proteina (PerCp). Per caratterizzare le CSCs si è valutata l'espressione dei seguenti antigeni di superficie, inclusi CD34, CD45, CD44, CD105 e CD90.

3.2.1.8.1 METODICA

L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata sulle linee cellulari primarie di OS e successivamente sulle rispettive linee di OS-CSCs ottenute dal saggio delle sarcosfere. È stata effettuata al P3 per entrambi le tipologie di linee cellulari. Gli epitopi analizzati sono stati marcati con i seguenti anticorpi: CD-44-Pe/Cy7 (Abcam); CD-45-PerCP (Abcam); CD-105-FITC (Abcam); CD-34-PE (Abcam) e il CD-90-APC (Abcam). Una volta raggiunto l'80% di confluenza il monostrato cellulare è stato tripsinizzato e disaggregato a formare una sospensione cellulare, la cui densità è stata valutata mediante conta in camera di Bürker per ottenere una sospensione cellulare di 1×10^5 cellule/mL. Sono state preparate 5 sospensioni cellulari analoghe per ciascuno degli epitopi presi in esame. Le sospensioni cellulari aliquotate in provette diverse, sono state centrifugate a 400 x g per 5 min e il pellet cellulare ottenuto è stato lavato diverse volte con una soluzione tampone di lavaggio (EDTA 2mM, 0.5% di BSA, 0.09% NaN₃ in DPBS) per eliminare eventuali detriti. I singoli pellet sono stati risospesi e incubati per 20 min a RT al buio. Successivamente sono stati centrifugati e sottoposti a varie lavaggi con l'apposito tampone di lavaggio per eliminare tutto il possibile anticorpo in eccesso. Le singole sospensioni cellulari sono state trasferite in vials apposite per il citofluorimetro (CyFlow Space, SysmexPartec) e analizzate con il software FlowMax, in dotazione allo strumento.

3.2.2 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

3.2.2.1 ESTRAZIONE DI RNA

L'estrazione di RNA dalle cellule delle linee primarie di OS e di OS-CSCs per valutare l'espressione dei geni caratteristici del fenotipo staminale e tumorale è stata eseguita su cellule a P3-P4 a seconda delle linee.

Per l'isolamento dell' RNA totale è stata eseguita un'estrazione selettiva utilizzando il QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN), nel rispetto delle condizioni sperimentali imposte dal produttore. Tutti i passaggi nei quali si lavora con l'RNA sono stati eseguiti in contenitori sterili privi di RNAsi. Dopo l'estrazione, per valutare la concentrazione e la purezza dell'RNA estratto si ricorre alla lettura spettrofotometrica a 260 nm (per gli acidi nucleici) e 280 nm (per le proteine). La concentrazione totale dell'RNA estratto viene espressa in µg/mL e contemporaneamente lo strumento valuta la purezza del campione attraverso il rapporto tra i due valori di assorbanza misurati che di norma ha un valore compreso tra 0.2 (prevale la componente di DNA o RNA) e 2.0 (prevale la componente proteica).

Dopo la quantificazione si procede alla verifica dell'integrità dell'RNA estratto tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 0,8%.

Gel di agarosio che è stato preparato con TBE, 1x (tampono **T**ris **B**orato **E**DTA), con aggiunta di Midori Green Advance DNA stain (NIPPON Genetics EUROPE GmbH), agente intercalante non cancerogeno alternativo al bromuro di etidio, che si frappone tra le basi azotate ed è evidenziabile da una lampada ultravioletta (UV). In tale modo è stato possibile visualizzare su gel l'integrità delle bande di rRNA (3 bande: 28s, 18s e 5s) e l'eventuale contaminazione di DNA. I campioni di RNA estratti sono stati conservati a -80°C.

3.2.2.2 REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE

Gli RNA estratti sono stati convertiti (retrotrascritti) in cDNA, DNA complementare a singolo filamento, per poter svolgere la funzione di stampo per le successive reazioni di amplificazione qualitativa. La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita mediante l'utilizzo del kit Quantitect reverse Transcription Kit (QIAGEN), nel rispetto delle condizioni sperimentali imposte dal produttore. Pertanto è stato retrotrascritto 1 µg di RNA totale con il kit Qiagen come da protocollo incluso (Tabella 1).

Purificazione da genomico	Profilo termico
<u>Volume finale 14µl</u> 2µl gDNA Wipeout Buffer, 7X 1µl RNA (1µg) 11µl H ₂ O RNA-asi free	42°C per 2 minuti
RT (RetroTrascrizione)	Profilo termico
<u>Volume finale 20µl</u> 1µl Quantiscript Reverse Transcriptase 4µl Quantiscript RT Buffer, 5X 1µl RT Primer Mix 14µl Template RNA purificato da genomico	42°C per 30 minuti 95°C per 3 minuti

Tabella 1. Condizioni di RT

Come controllo dell'avvenuta retrotrascrizione viene eseguita una PCR per β -Actina e quindi l'amplificato viene visualizzato su gel di agarosio al 2%) a cui è stato aggiunto il Midori Green Advance DNA stain (NIPPON Genetics EUROPE GmbH).

3.2.2.3 PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una metodica che permette l'amplificazione *in vitro* di una specifica sequenza di cDNA e fu inventata da Kary Mullis alla fine degli anni '80 [95]. Il principio su cui si basa è l'attività di sintesi dell'enzima *Taq* polimerasi, estratta dal batterio *Thermophilus Aquaticus*. I principali componenti della reazione di PCR sono: a) il cDNA, che funge da stampo per la sequenza da amplificare, b) due *primers* (senso e antisenso) che ibridandosi alle estremità della sequenza d'interesse, individueranno la sequenza da amplificare, c) una DNA polimerasi, la *Taq* polimerasi, essendo stabile alle alte temperature, d) Nucleotidi (**A** (Adenina), **G** (Guanina), **C** (Citosina) e **T** (Timina)) necessari alla sintesi di nuovo DNA, e) buffer, che fornisce l'ambiente chimico adatto all'attività della DNA polimerasi. L'amplificazione della sequenza d'interesse vien effettuata tramite diversi cicli, ciascuno dei quali prevede tre fasi fondamentali:

- **Fase di Denaturazione (Melting)**: prevede il trattamento del DNA ad alte temperature (**94°-95°C**) per separare la doppia elica di DNA, rendendo così il filamento accessibile ai *primers*;
- **Fase di Appaiamento (Annealing)**: fase in cui i *primers* si appaiono al filamento complementare. La temperatura di questa fase viene scelta e calcolata sulla base del primer che si andrà ad utilizzare. Viene scelta sulla base della temperatura di *melting*, ovvero la temperatura massima oltre il quale il *primer* si denatura perdendo la capacità di appaiarsi in maniera specifica al filamento stampo del cDNA;
- **Fase di Estensione 70-75°C (Elongation)**: Fase in cui la *Taq* polimerasi lavora sintetizzando il nuovo filamento di DNA complementare al DNA stampo, a partire dai due *primers*. La temperatura è di 72°C.

In Tabella 2 sono riportate le sequenze dei primers specifici utilizzati.

Gene	Oligonucleotidi	Sequenza (5'-3')	Amplicone (bp)	T _a (°C)
SATB2	Forward	TGTCTATCATGTTGTGACGTTGA	150	63
	Reverse	TCATCTCTTTGAGCAGTTCCTTTA		
REX1	Forward	AGAAGAGGCCTTCACTCTAGTA	106	55
	Reverse	CACCAGGATATATCAACCACCTC		
MYC	Forward	GCTGCTTAGACGCTGGATTTTT	110	63
	Reverse	GAGTCGTAGTCGAGGCATAGT		
Nanog	Forward	CCCAGCTGTGTGTACTCAAT	87	60
	Reverse	GGTTCAGGATGTTGGAGAGTT		
POU5F1	Forward	GGGAGGAGCTAGGGAAAGA	77	60
	Reverse	TCCTTCCTTAGTGAATGAAGAACT		
Sox2	Forward	TGCAGTACAACCTCCATGA	125	55
	Reverse	GGACTTGACCACCGAACC		
KLF4	Forward	CGGGAAGGGAGAAGACACT	79	60
	Reverse	AGTCGCTTCATG TGGGAGA		
LIN28A	Forward	CGACTGTAAGTGGTTCAAC	100	60
	Reverse	CCTTCCATGTGCAGCTTACT		
PROM1	Forward	CCAGAAGCCGGGTCAAAT	127	60
	Reverse	ATTCACTCAAGGCACCATCC		
EZR	Forward	GCCTTCTTGTCGATGGGTTA	134	61
	Reverse	GCCTCTTGTCGATGGGTTA		
AXL	Forward	TTAGTGCTACGCGGAATGG	133	60
	Reverse	CCTATGTCCATAGCACCTCG		

Tabella 2. Primers utilizzati (**bp**, base pairs of amplicon size; **T_a**, annealing temperature)

4. RISULTATI

4.1. ALLESTIMENTO DELLE COLTURE PRIMARIE E DELLE LINEE CELLULARI FINITE DI OSTEOSARCOMA

Sono stati collezionati 13 campioni biotici di osteosarcoma (OS) da pazienti che si sono sottoposti a trattamento chirurgico presso l'Unità di "Ortopedia Oncologica ricostruttiva", AOUC, Firenze. L'analisi istopatologica ha rivelato che di questi 14 campioni, 11 sono OS convenzionali (OSA), tra cui è presente 1 OSA osteoblastico, 1 OSA condroblastico e 1 OSA fibroblastico; 1 è un OS teleangectasico (OST); 1 è un OS a piccole cellule (SCO). L'analisi istopatologia è stata condotta dalla Sezione di Anatomia Patologica, del Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale dell'Università di Firenze, Firenze. I campioni biotici di OS ottenuti con la tecnica dell'ago aspirato o mediante resezione chirurgica di una porzione del tumore (Figura 6A,B), trattati come descritto nella sezione precedente, hanno permesso di stabilire delle colture primarie di OS.

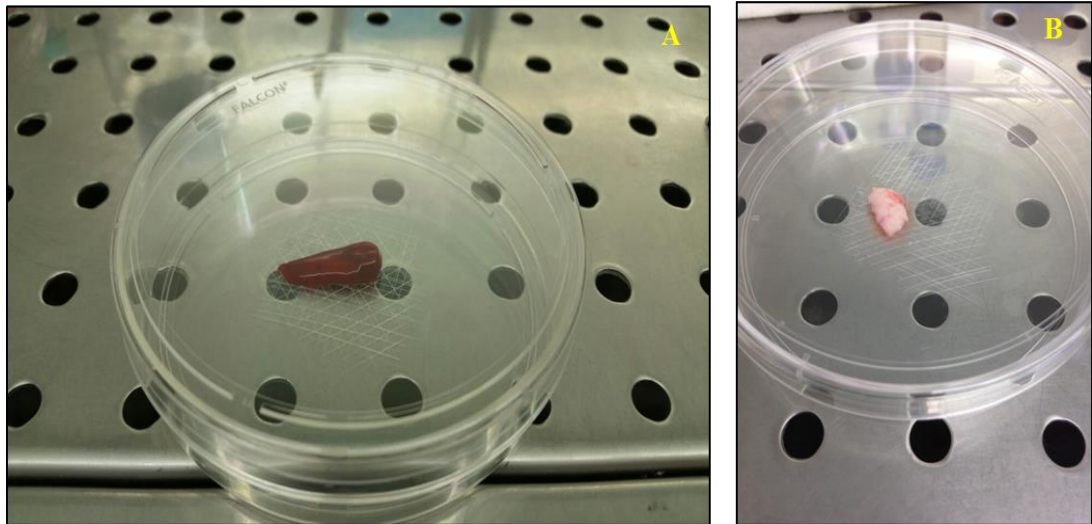


Figura 6. Campione biotico di OS convenzionale da ago aspirato (A) e campione biotico di OS da prelievo chirurgico (B).

Sfortunatamente, il numero di cellule isolate dalle biopsie ossee è piuttosto basso, con una resa del trattamento del 20 – 50% (Figura 7).

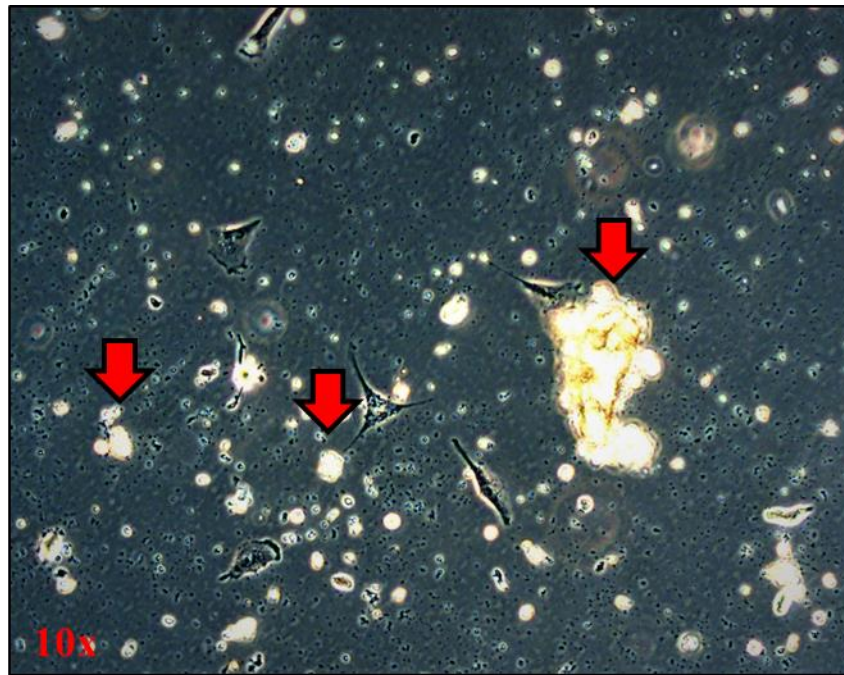


Figura 7. Coltura primaria di OSA. Evidenziate dalle frecce rosse diversi frammenti ossei, circondati da cellule in adesione. Osservazione in contrasto di fase. Obiettivo 10X.

Resa che è, infatti, risultata essere molto legata alla tipologia di tecnica utilizzata e alla dimensione del tessuto. In relazione a questo, è stato osservato in questi anni che i campioni biotipici derivanti dalla resezione chirurgica avevano una resa maggiore rispetto agli altri ottenuti mediante ago biopsie.

Per le ragioni sopra elencate le cellule isolate dai frammenti biotipici devono essere opportunamente trattate per far sì che le colture primarie raggiungano in almeno un mese la confluenza in una piastra Petri da 100 mm di diametro. Successivamente, da queste sono state ottenute le rispettive linee cellulari finite che sono state subcoltivate, sia per procedere nel nostro studio all'isolamento delle cellule staminali tumorali (CSCs, *Cancer Stem Cells*) e per criconservarle in azoto liquido. Ognuna delle linee cellulari di OS è stata opportunamente siglata. Per quanto riguarda le 12 linee di OS convenzionale, sono state marcate come OSA, seguito da un numero progressivo da 1 a 12 (Figura 8A-M).

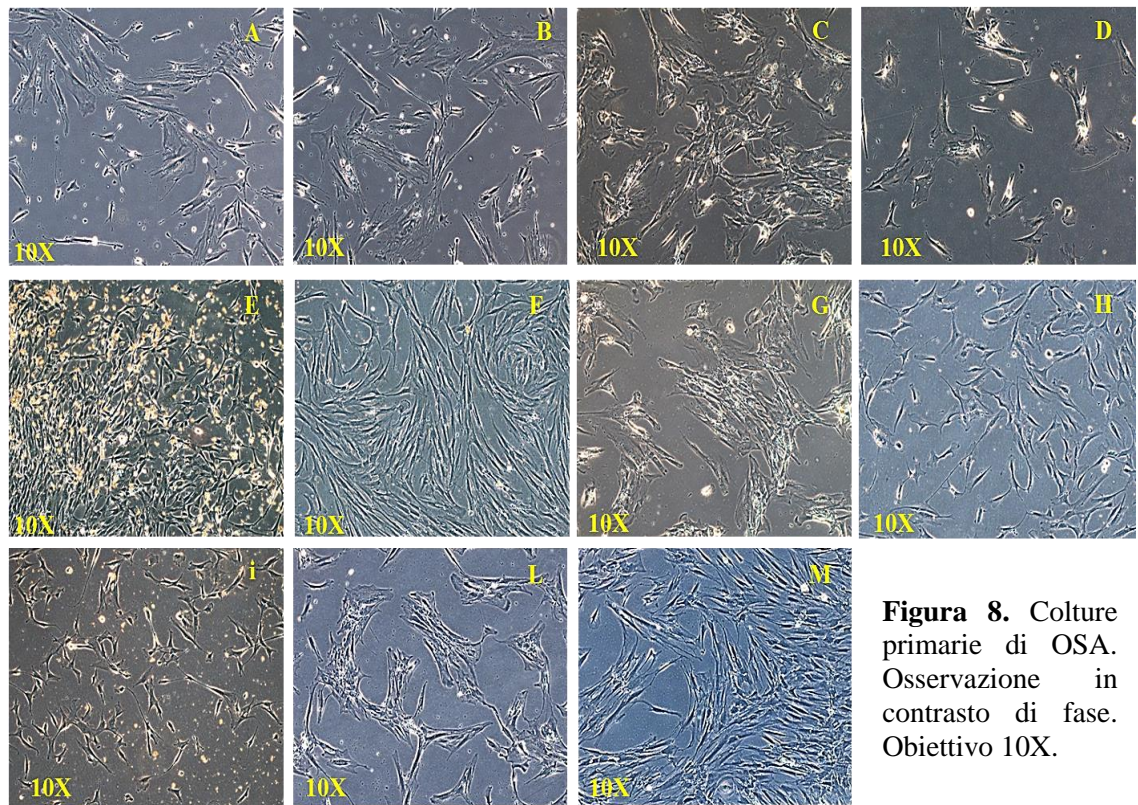


Figura 8. Colture primarie di OSA. Osservazione in contrasto di fase. Obiettivo 10X.

La linea cellulare ottenuta dall'OS telangectasico, è stata siglata come OST-1 (Figura 9).

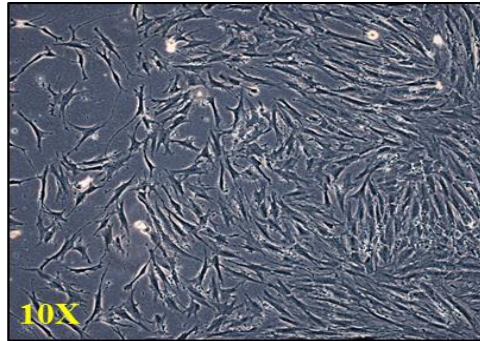


Figura 9. Coltura primaria di OS teleangiectasico (OST). Osservazione in contrasto di fase. Obiettivo 10X

La linea cellulare ottenuta dall'OS a piccole cellule (SCO), è stata siglata come SCO-1 (Figura 10).

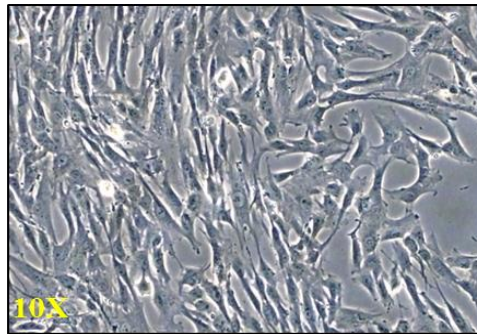


Figura 10. Coltura primaria di OS a piccole cellule (SCO). Osservazione in contrasto di fase. Obiettivo 10X.

Dato l'elevato numero di linee cellulari di OSA prese in esame, è stato deciso di mostrare in questa tesi soltanto i risultati relativi ad una delle 12 linee, quale linea rappresentativa delle altre, avendo dato tutte analoghi.

4.2.SAGGIO DELLE SARCOSFERE: FORMAZIONE E ISOLAMENTO

Il saggio di formazione delle sfere cellulari, o saggio di crescita in non adesione, è stato realizzato per ciascuna delle linee cellulari finite di OS sopra descritte. Quando le cellule di ciascuna linea cellulare finita, al P1-P2 di subcoltivazione, hanno raggiunto la confluenza, sono state trattate con Tripsina-EDTA, staccate e seminate in piastre da 6 pozzetti a bassissima adesività per il saggio in non adesione. Questa particolare tipologia di piastre è stata utilizzata perché permette di mantenere le cellule in sospensione, impedendo che aderiscano al substrato. Così, il loro utilizzo ha permesso di ricreare *in vitro* una condizione di stress per le cellule, rappresentata dall'impossibilità di aderire al substrato. Condizione che è necessaria per l'isolamento delle CSCs, essendo la capacità di crescita in condizioni di non adesione una delle loro caratteristiche. Le piastre allestite per il saggio sono state mantenute per un tempo di 21-28 gg a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in incubatore. La durata del saggio è stata variabile proprio in base al tempo impiegato dalle cellule delle diverse linee per formare le colonie sferiche definite appunto "sarcosfere". Durante il saggio, ogni tre giorni, sono state aggiunte aliquote fresche dei fattori di crescita necessari (i.e. EGF e il b-FGF). A 24 h dall'allestimento del saggio le cellule in sospensione apparivano ben isolate le une dalle altre (Figura 11A). A 7 gg è stato possibile cominciare a osservare la presenza di piccole colonie sferiche in sospensione (Figura 11B), che sono cresciute nel tempo. A 28 gg dall'allestimento del saggio è stata osservata la presenza di grandi e luminose colonie sferiche in sospensione, in ciascun dei sei pozzetti (Figura 11C).

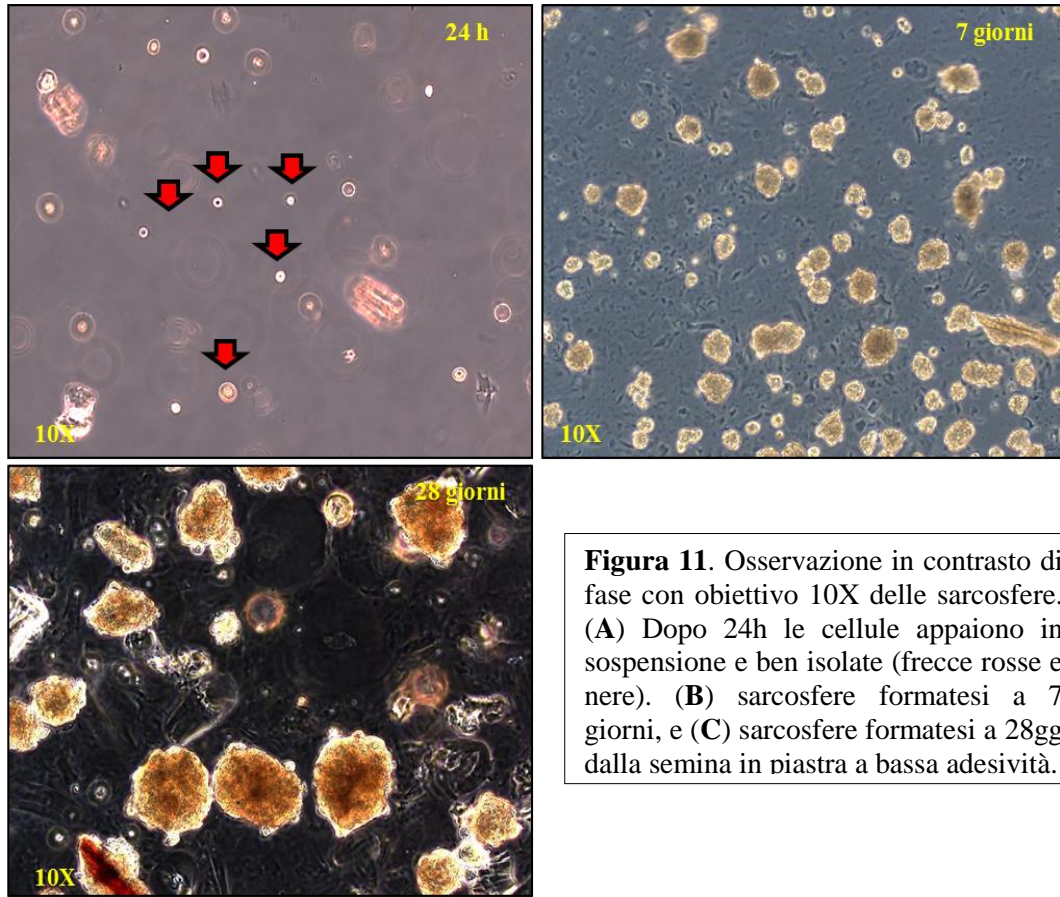


Figura 11. Osservazione in contrasto di fase con obiettivo 10X delle sarcosfere. (A) Dopo 24h le cellule appaiono in sospensione e ben isolate (freccie rosse e nere). (B) sarcosfere formatesi a 7 giorni, e (C) sarcosfere formatesi a 28gg dalla semina in piastra a bassa adesività.

A questo punto è stato possibile procedere all'isolamento delle sarcosfere mediante filtrazione con camere e membrane filtranti (referenza nostra). Le sarcosfere così recuperate dalle piastre a bassissima adesività sono state trasferite in nuove piastre Petri da 60 mm di diametro, in condizioni di normale adesione (Figura 12).

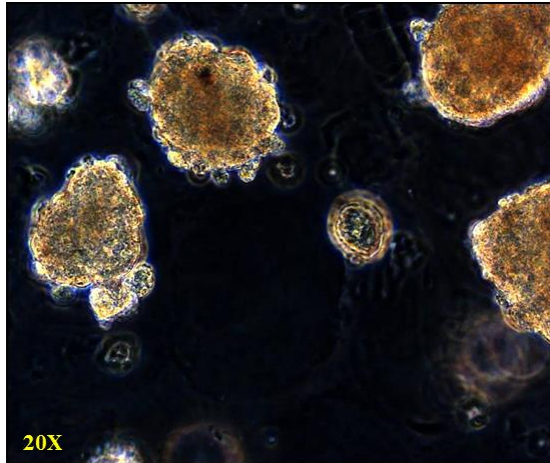


Figura 12. Osservazione in contrasto di fase con obiettivo 20X delle sarcosfere appena isolate.

Già a 24h dalla semina in condizioni di normale adesione è stato possibile osservare come le sarcosfere si siano adese immediatamente al substrato ed abbiano iniziato ad espandersi (Figura 13A) fino a creare in 7 gg un nuovo monostrato cellulare (Figura 13B).

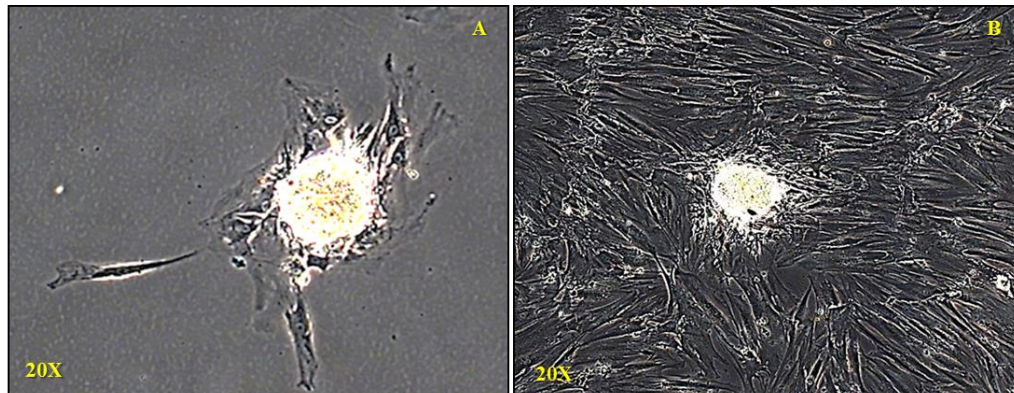


Figura 13. Osservazione in contrasto di fase con obiettivo 20X delle sarcosfere isolate e riseminate in condizioni di normale adesione. (A) sarcosfere a 24 h dall'isolamento e (B) a 7 gg dall'isolamento.

4.3.LINEE CELLULARI STAMINALI TUMORALI DA OSTEOSARCOMA

Le cellule liberate dalle sarcosfere, espandendosi hanno dato origine a possibili linee cellulari di CSCs. Pertanto per OS preso in esame sono state allestite linee di possibili CSCs (Figura 14).

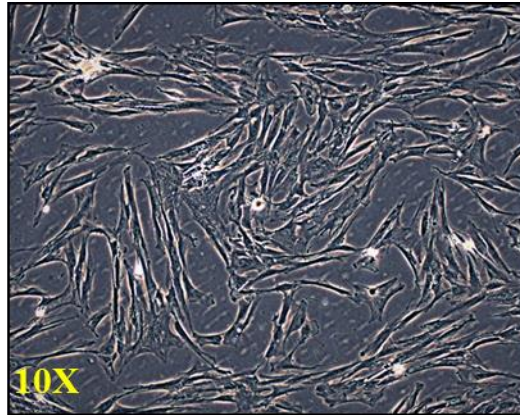


Figura 14. Linea cellulare di OS –CSCs. Osservazione in contrasto di fase. Obiettivo 10X.

Queste sono state siglate, come: a) OSAn-CSCs, dove n è seguito da un numero progressivo (1-12), ad indicare la linea cellulare primaria di origine, b) OST-1-CSCs per la linea ottenuta dal saggio delle sarcosfere a partire dalla linea cellulare primaria di OST, c) SCO-1-CSCs per la linea ottenuta dal saggio delle sarcosfere a partire dalla linea cellulare primaria SCO-1.

Le linee di CSCs sono state subcoltivate in CSC-GM (*Cancer Stem Cells Growth Medium*) sia per poter condurre *in vitro* tutte le analisi necessarie alla loro caratterizzazione come linee effettive di staminali tumorali da OS, sia per crioconservarle in azoto liquido, per futuri esperimenti.

Tutte le linee di OS-CSCs isolate mediante il saggio delle sarcosfere, sono state sottoposte a tutte le analisi di caratterizzazione. Analisi che sono state condotte su cellule al P3-P4 di subcoltivazione cellulare.

4.3.1. VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Le linee cellulari di CSCs sono state coltivate in GM, ovvero in terreno di crescita basale senza l'aggiunta di b-FGF per analizzare l'andamento della crescita delle cellule senza nessun tipo di stimolo o d'induzione. Per la valutazione della capacità proliferativa sono state allestite varie curve di crescita, per tutte le linee di OS-CSCs. : Le cellule sono state contate a distanza di 24 ore per un totale di 5 punti, compreso il T₀. La buona correlazione tra tempo di crescita e numero di cellule viene valutata mediante il coefficiente di determinazione R², che è risultato essere sempre maggiore di 0,90. Dato positivo alla luce del fatto che in genere nella ricerca biologica si assume che un buon *fitting* si abbia quando R² > 0.60 (Figure 15A, B e C). Dato l'elevato numero di linee cellulari prese in esame, di seguito sono mostrate le curve di crescita della linea OSA8-CSCs, quale rappresentativa delle linee di OSA \mathbf{n} -CSCs, della linea OST-1-CSCs e della linea SCO-1-CSCs.

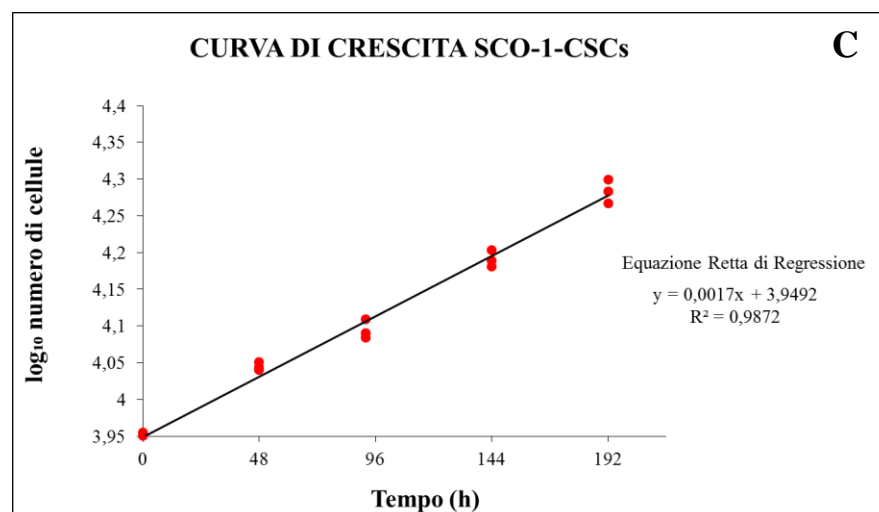
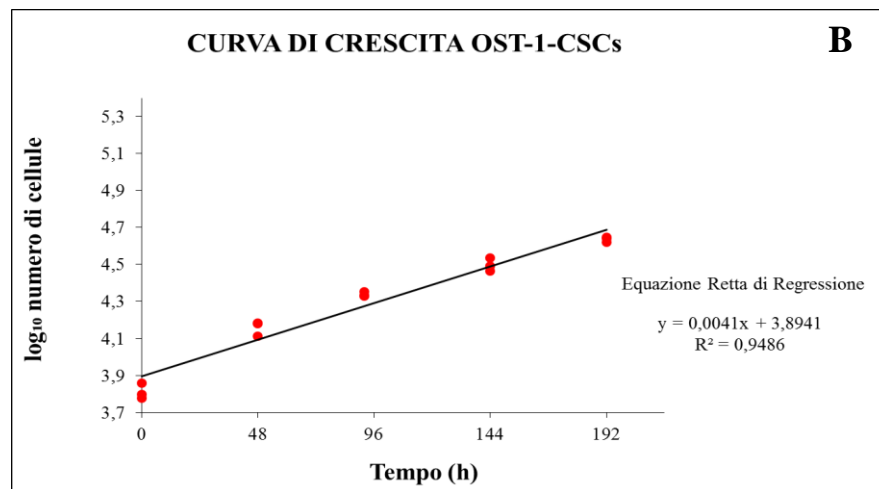
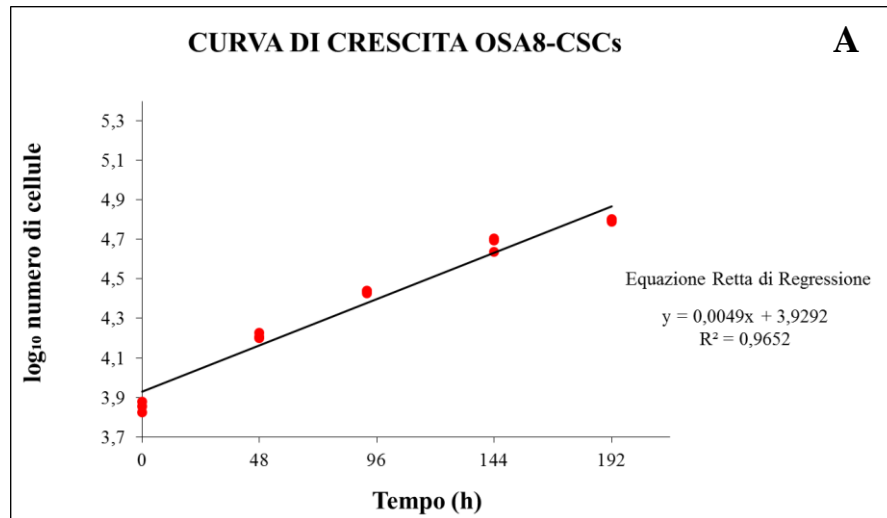


Figura15. Grafici in regressione lineare della fase log delle curve di crescita della linea OSA8-CSCs (A), della linea OST-1-CSCs (B) e della linea SCO-1-CSCs (C), coltivate in terreno di crescita basale. Di ogni retta sono riportati l'equazione e il valore R^2 .

4.3.2. VALUTAZIONE *IN VITRO* DELLA CAPACITÀ CLONOGENICA

La capacità clonogenica delle OS-CSCs è stata valutata mediante il saggio delle unità formanti colonie (CFU) (Figura 16). Le cellule sono state piastrate a bassissima densità ($45\text{cellule}/\text{cm}^2$), in CFU-GM (*Colony Forming Unit Growth Medium*) e mantenuta in coltura per un tempo non superiore alle 4 settimane, così da permettere ad ogni campione di formare colonie. Dove per colonie s'intendono aggregati cellulari composti da un numero di cellule non inferiore a 50. Una volta formatesi le colonie, i campioni sono stati fissati in formaldeide e successivamente colorati con blu di toluidina per rivelare le colonie formatesi. Queste sono state osservate e contate in microscopia ottica in campo chiaro. Nonostante il tempo limite fosse stato fissato a 4 settimane, tutte le OS-CSCs hanno fatto osservare la presenza di colonie già a 3 settimane. Il tasso clonogenico è stato osservato essere per le OSA8-CSCs, quale rappresentante delle altre OSAn-CSCs, del 34%, per la linea OST-1-CSCs del 64% e per la linea SCO-1-CSCs del 27%.

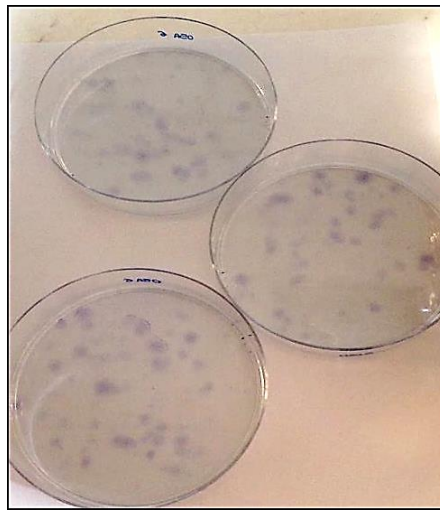


Figura 16. Saggio delle Unità Formanti Colonie (CFU), colonie fissate in piastra e colorate con blu di toluidina

4.3.3. VALUTAZIONE *IN VITRO* DELLA CAPACITÀ TUMORIGENICA

Il saggio di crescita in soft agar è un saggio di crescita in condizioni ancoraggio-indipendenti, che è considerato uno dei più rigorosi test *in vitro* per lo studio della trasformazione neoplastica. La capacità delle cellule di formare colonie in terreno semi-solido è infatti considerata indice di trasformazione neoplastica connessa alla tumorigenicità. Il saggio è stato condotto su ciascuna linea di OSA-CSCs isolata, sulle altre due linee, quali OST-1-CSCs e SCO-1-CSCs e contemporaneamente sulla linea continua, SaOS-2 e sulla linea cellulare PA41. Queste ultime sono state in questo saggio utilizzate rispettivamente come controllo positivo e negativo. Inoltre, anche le linee primarie di OS, da cui sono state isolate le possibili CSCs sono state sottoposte al saggio. Il saggio, condotto su cellule giunte al P4 di subcoltivazione, ha avuto una durata di 4 settimane, durante le quali ogni 3 gg, 2 mL di terreno di crescita base (GM) sono state aggiunte per mantenere l'umidità del terreno. Le colonie formatesi sono state osservate contate in microscopia ottica in contrasto di fase (Figura 17 A-E). Dopo 4 settimane è stata osservata la capacità di formare colonie sferiche soltanto da parte delle linee di OS-CSCs (i.e OSA8-CSCs, OST-1-CSCs e SCO-1-CSCs), come fatto dalla linea SaOS-2. Le tre linee hanno presentato un tasso di efficienza clonogenica del 60%, 72% e del 63%, rispettivamente per ciascuna linea, valori simili a quello delle SaoS-2 (61%). Mentre è stata valutato un tasso di clonogenicità di meno del 10% per le linee cellulari primarie e un tasso pari a zero per la linea di PA. Come linea cellulare primaria di OS convenzionale di cui mostrare i risultati rappresentativi dell'esito del saggio di crescita in agar soft è stata scelta la linea OSA8.

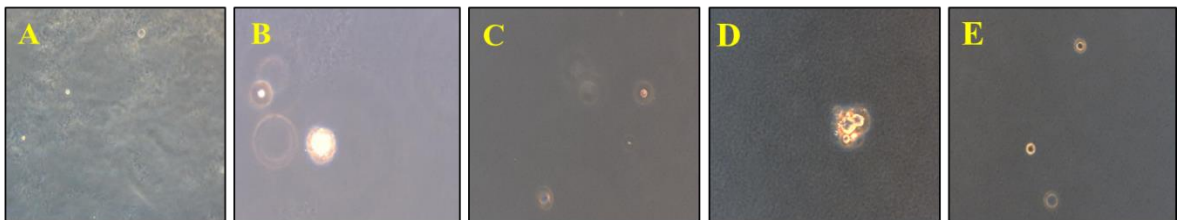


Figura 17. Saggio di crescita in agar soft. Dopo 24 h dall'allestimento del saggio le cellule appaiono isolate nell'agar (A). Mentre, dopo 4 settimane si osserva la presenza di grandi colonie sferiche in OSA8-CSCs (B) e nella linea SaOS-2 (D), mentre queste sono totalmente assenti nella linea OSA8 (C) e nella linea di PA (E). Osservazione a contrasto di fase con obiettivo 10X

4.3.4. VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DIFFERENZIATIVA

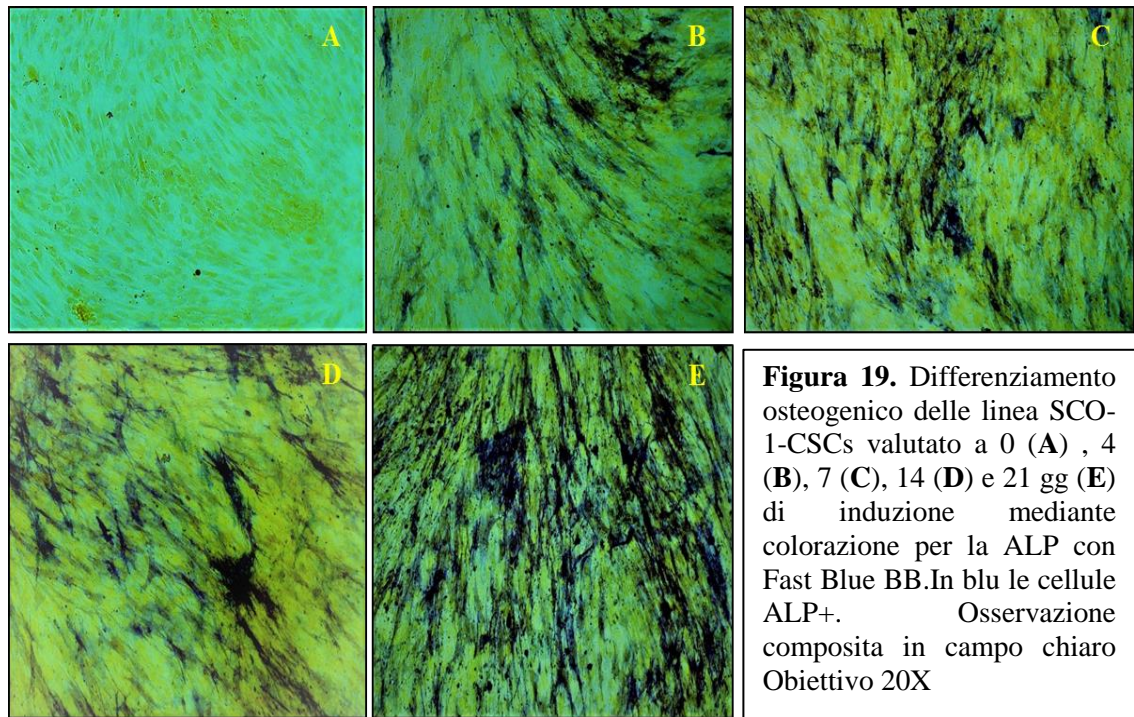
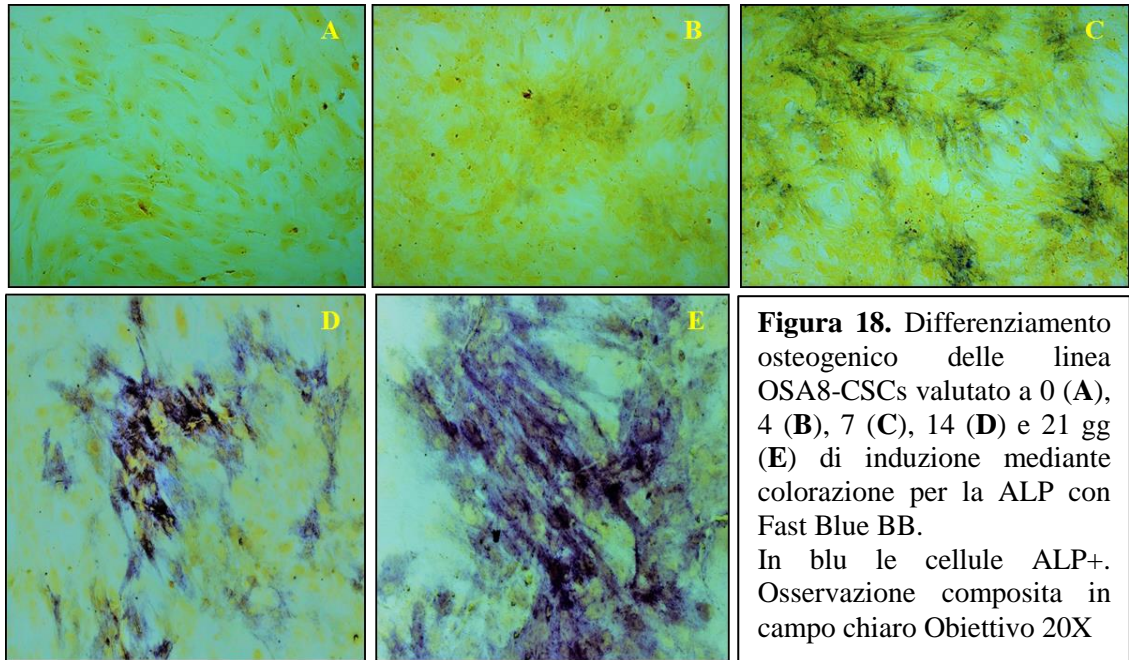
Di tutte le linee di OSA-CSCs (da OSA1-CSCs a OSA13-CSCs) e delle linee OST-1-CSCs e SCO-1-CSCs è stata valutata la capacità differenziativa. Valutazione che è stata fatta per valutare la multipotenza delle CSCs e studiarne così il fenotipo staminale mesenchimale, caratteristico delle CSCs. A tale scopo le linee sopra elencate sono state indotte a differenziare sia in senso osteoblastico sia in senso adipogenico, mediante l'utilizzo di appositi terreni differenzianti.

4.3.4.1. DIFFERENZIAZIONE OSTOGENICA

4.3.4.1.1. VALUTAZIONE QUALITATIVA DELL'ATTIVITÀ DELLA FOSFATASI ALCALINA

Il livello di differenziazione osteogenica delle popolazioni cellulari OSA-CSCs (da OSA1-CSCs a OSA13-CSCs), OST-1-CSC e SCO-1-CSC è stato valutato, qualitativamente, mediante la colorazione citochimica dell'enzima Fosfatasi Alcalina (ALP). Le linee cellulari sopra elencate, quando coltivate in condizioni di non induzione, ovvero in solo terreno di crescita base (CSCs-GM) (*Cancer Stem Cells Growth Medium*), hanno mostrato un'attività di ALP assente o pressoché limitata (cellule presenti ALP+ \leq 1%).

Questo a conferma che nelle linee di CSCs isolate è presente un'assenza basale di differenziazione in senso osteogenico. La coltura delle stesse in condizioni differenzianti fino a 21 gg ha mostrato, invece, un aumento progressivo del numero di cellule positive alla presenza della ALP (ALP+) fino al raggiungimento del quasi 100% di cellule positive. Per lo studio nel tempo del differenziamento osteogenico, le cellule soggette ad induzione sono state fissate in formaldeide. Successivamente sono state colorate a 0, 4, 7, 14 e 21 gg dall'inizio dell'induzione (Figura 18A-E, Figura 19A-E e Figura 20A-E).



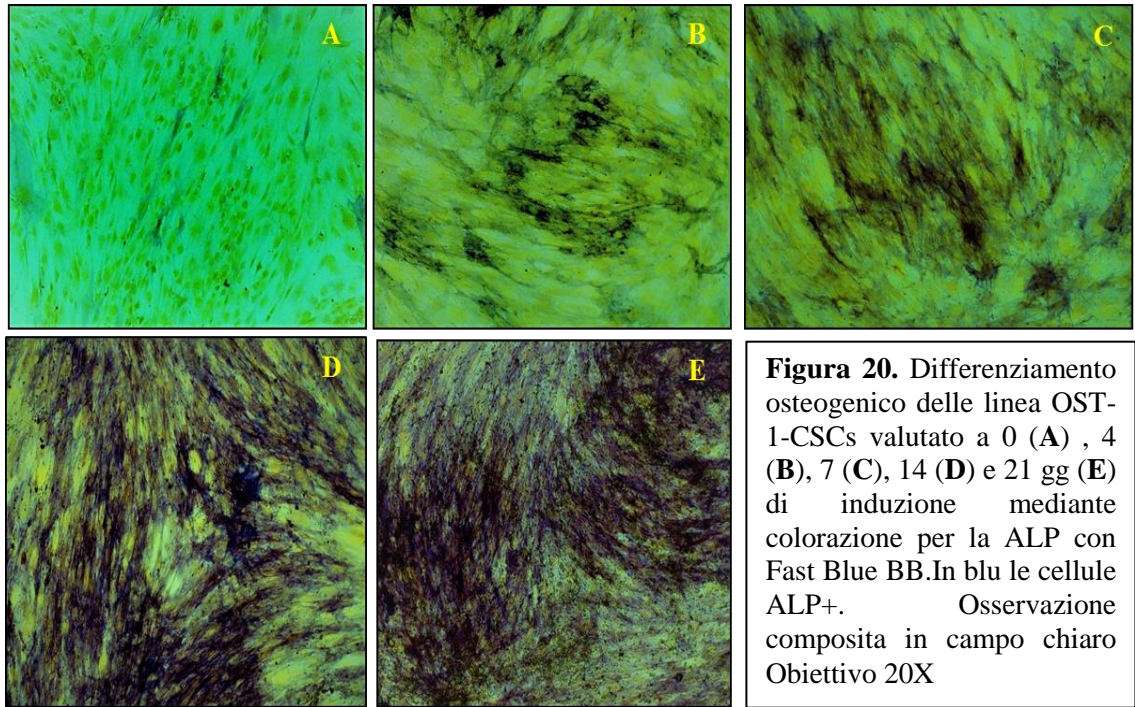


Figura 20. Differenziamento osteogenico delle linea OST-1-CSCs valutato a 0 (A) , 4 (B), 7 (C), 14 (D) e 21 gg (E) di induzione mediante colorazione per la ALP con Fast Blue BB. In blu le cellule ALP+. Osservazione composta in campo chiaro Obiettivo 20X

A 0 giorni (Figura 18A e 19A) né la linea OSA8-CSCs né la linea SCO-1-CSCs hanno presentato cellule positive all'ALP. Cellule che invece sono risultate essere presenti, seppure in piccola percentuale (< 1%) nella linea indotta OST-1-CSCs (Figura 20A). È stato poi osservato che già dopo 4 giorni (Figura 18B, 19B e 20B), invece, si inizia a notare, in tutti e tre tipi cellulari, la presenza di cellule sparse che iniziano ad esprimere ALP, seppur con leggera o media intensità, circondate da altre cellule negative. Il numero di cellule ALP+ è stato osservato aumentare nel tempo in tutte e tre le linee, che hanno presentato sia a 7 sia a 14 gg un notevole aumento della positività (Figura 18C-D, 19C-D e 20C-D). Infine, a 21 giorni dall'inizio dell'induzione, la quasi totalità dei campioni è risultata essere fortemente positiva per l'ALP, con solo qualche cellula negativa sparse (Figura 18E, 19E e 20E). A 21 gg è stata anche osservata la presenza di diversi depositi di calcio mineralizzato (Figura 18E, 19E e 20E, dove i depositi sono di colore nero).

4.3.4.1.2. DOSAGGIO FLUORIMETRICO DELL'ATTIVITA' DELLA FOSFATASI ALCALINA

Il livello di differenziazione osteogenica delle popolazioni cellulari OSA-CSCs (da OSA1-CSCs a OSA13-CSCs), OST-1-CSC e SCO-1-CSC è stato valutato quantitativamente mediante dosaggio fluorimetrico dell'attività enzimatica dell'ALP. L'attività dosata è stata espressa in $\mu\text{U}/\text{cm}^2$. Le linee cellulari sopra elencate sono state mantenute in coltura in GM e in specifico terreno di differenziazione osteogenica (OM, *Osteogenic Medium*) per un tempo da 0 a 21 gg. L'attività enzimatica è stata valutata a 0, 2, 4, 7, 10, 14, 18 e 21 gg, in seguito ai rapidi tempi di differenziazione osservati per ciascuna dei campioni presi in esame. Per tutte o tre le linee qui riportate è stato osservato un significativo incremento dei livelli di attività dell'ALP a partire dal 4 gg di induzione (Figura 21). Livelli enzimatici che sono andati ad aumentare progressivamente nel tempo, come confermato anche dall'osservazione qualitativa relativa all'espressione dell'ALP nelle linee cellulari. Di seguito sono riportati in grafico i dati elaborati relativi alla linea OSA8-CSCs, rappresentativa di tutte le linee di OSA-CSCs isolate, alla linea OST-1-CSCs e alla linea SCO-1-CSCs.

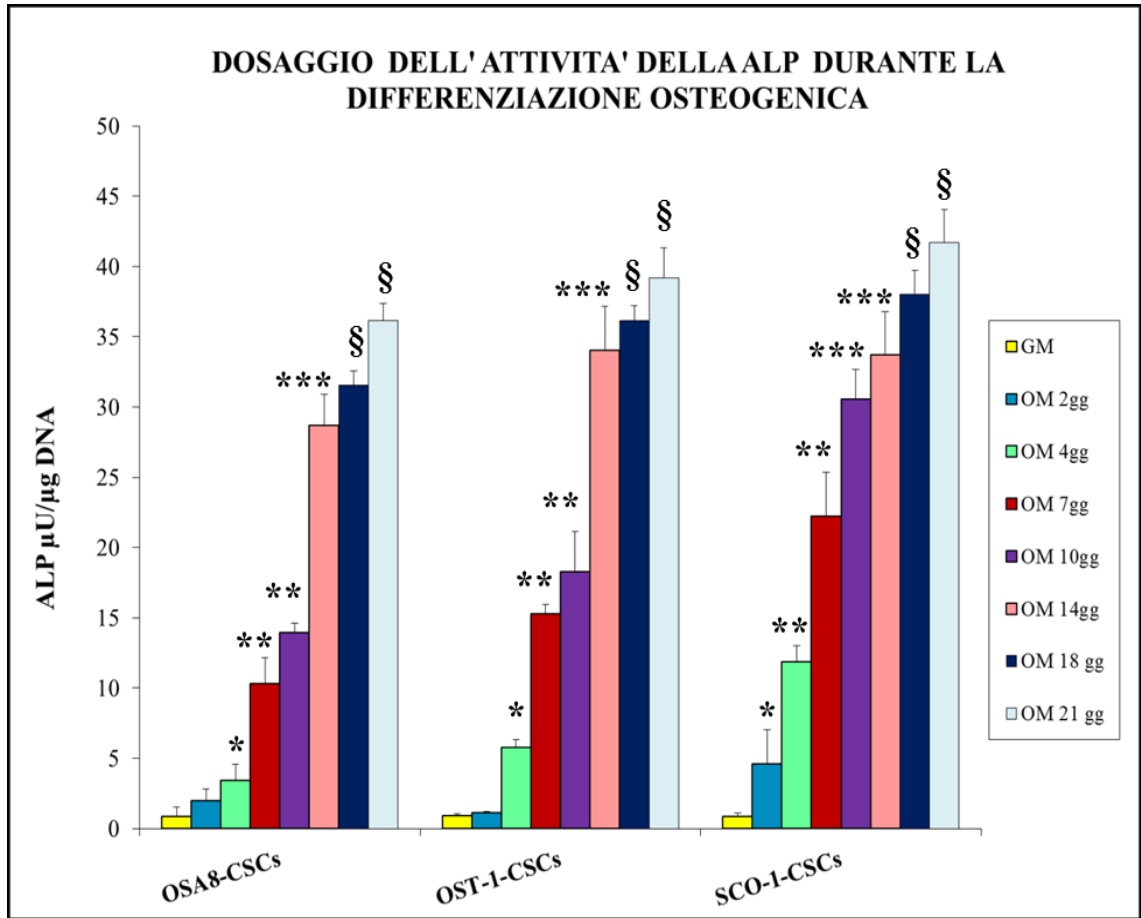


Figura 21. Analisi quantitativa dell'andamento nel tempo dell'attività della ALP per le tre linee di OS-CSCs sottoposte a induzione osteogenica. Barre di errore: Dv. Std. *p < 0.025 vs GM.; **p < 0.05 vs. GM; ***p < 0.001; §p < 0.0005

4.3.4.1.3. VALUTAZIONE QUALITATIVA DELLA FORMAZIONE DEI DEPOSITI DI IDROSSIAPATITE

Il livello di differenziazione osteogenica è stato valutato osservando la formazione dei depositi di idrossiapatite (HA). La valutazione è stata fatta qualitativamente mediante colorazione dei depositi di HA, con il colorante Alizarina Red S e successiva osservazione dei campioni al microscopio ottico in campo chiaro. Il saggio, condotto sulle linee di OSAn-CSCs (da OSA1-CSCs a OSA12-CSCs), OST-1-CSC e di SCO-1-CSC ha fatto osservare come già a partire da pochi giorni di induzione osteogenica (4 gg) le cellule presentino la formazione di noduli mineralizzati di idrossiapatite, il cui numero e dimensioni è stato osservato aumentare nel tempo (Figura 22A-F). A 0 gg di induzione non sono apprezzabili nei campioni depositi di HA, essendo le cellule ancora indifferenziate (Figura 22A). A 4 gg, invece, iniziano a formarsi nei campioni piccoli depositi di HA sparsi tra le cellule (Figura 22B). Questo è il segnale che le cellule, differenziandosi, hanno assunto la capacità di depositare HA. Infine, a 21 gg dall'inizio dell'induzione le cellule sono ricoperte da migliaia di granuli di HA (Figura 22F); È stato inoltre osservato che le cellule di forma fusata iniziano un poco a diminuire man a mano che i depositi aumentano, ma soprattutto è stato osservato che la maggior parte delle cellule a 21 gg oltre a formare depositi di HA, ha anche alti livelli di ALP (vedi paragrafi precedenti). Di seguito sono riportate le immagini rappresentative della formazione dei depositi di HA nella linea OSA8-CSCs, quale campione rappresentativo per tutte le linee di OS-CSCs sottoposte a induzione osteogenica.

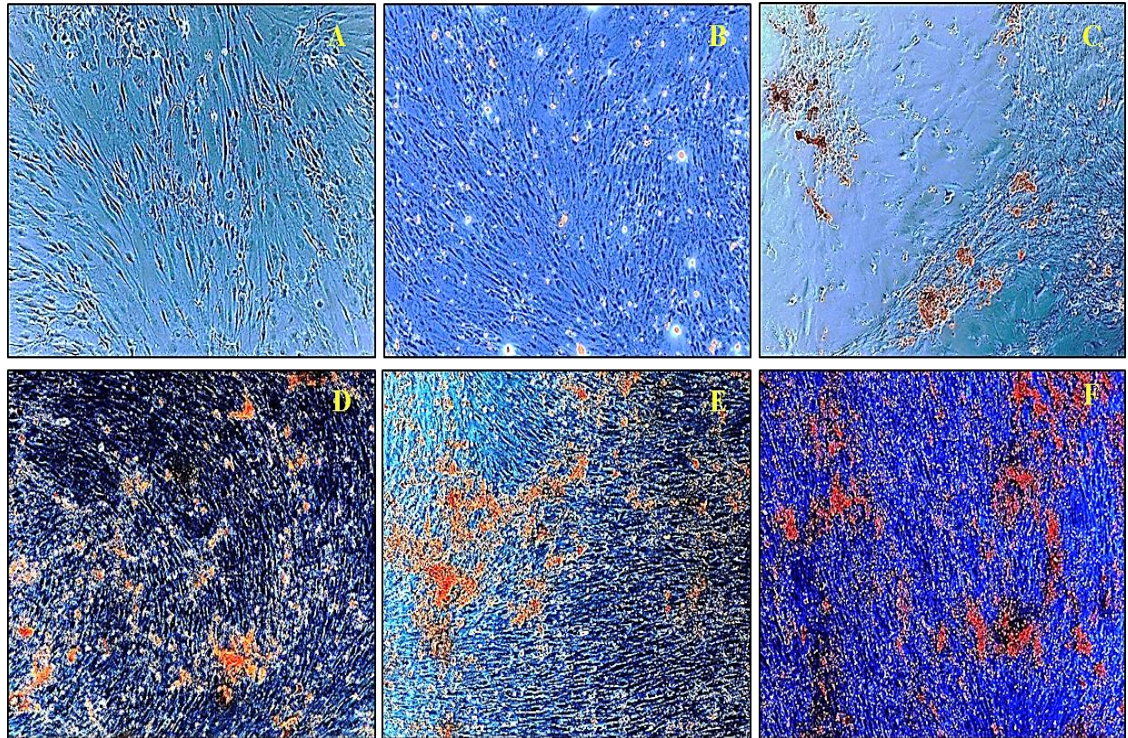


Figura 22. Differenziamento osteogenico valutato a 0 (A), 4 (B), 7(C), 14(D) e 21(E) gg di induzione mediante colorazione per la HA con Alizarina Red S. In rosso-arancio i depositi di HA. Cellule non colorate, contrastate in grigio/azzurro. Osservazione in contrasto di fase. Obiettivo 40X

4.3.4.1.4. DOSAGGIO FLUORIMETRICO DEI DEPOSITI DI IDROSSIAPATITE

Come ultimo saggio per la valutazione della capacità delle OS-CSCs isolate a differenziare in senso osteogenico è stato condotto un dosaggio fluorimetrico per valutare quantitativamente la produzione dei depositi di HA, rivelati con la colorazione citochimica precedentemente descritta. La valutazione è stata condotta su tutte le linee di OSA_n-CSCs (da OSA1-CSCs a OSA12-CSCs), OST-1-CSC e di SCO-1-CSC. Di seguito sono riportati in grafico i dati elaborati relativi alla quantità di HA prodotta dalla linee cellulari a diversi tempi di induzione (Figura 23).

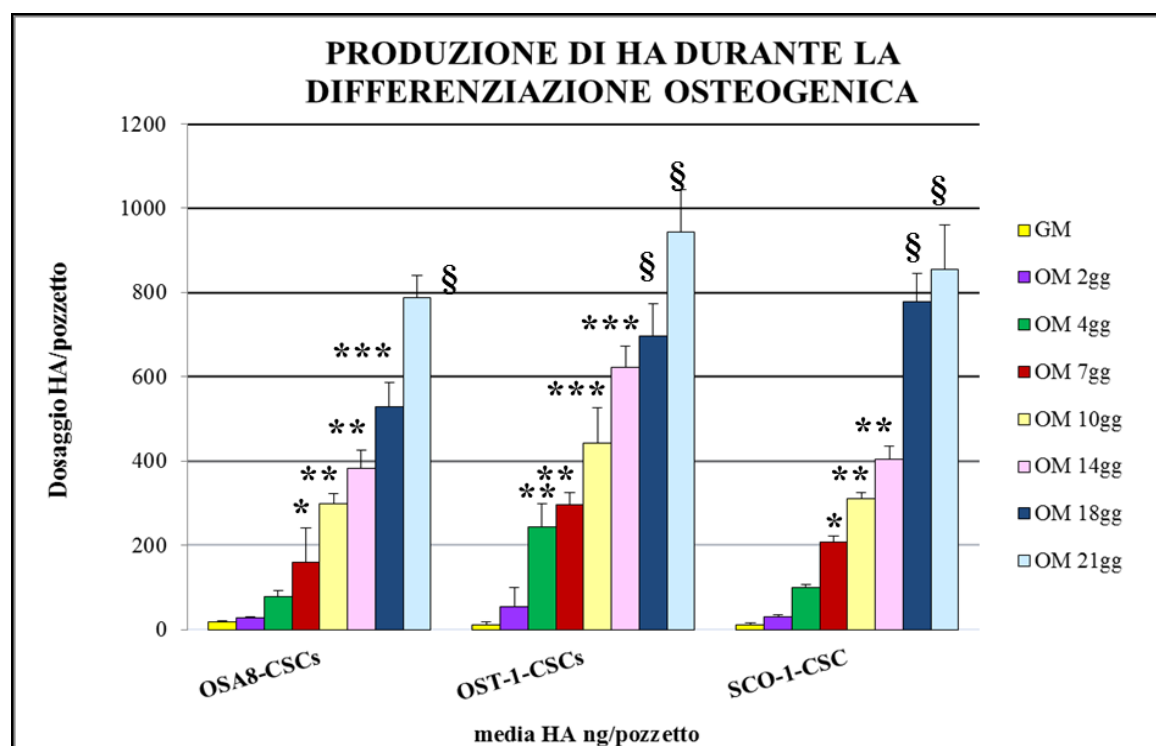


Figura 23. Analisi quantitativa dell'andamento nel tempo della produzione di HA da parte delle tre linee di OS-CSCs sottoposte a induzione osteogenica. Barre di errore: Dv. Std. *p < 0.025 vs GM.; **p < 0.05 vs. GM; ***p < 0.001; §p < 0.0005 vs. GM

4.3.4.2. DIFFERENZIAZIONE ADIPOGENICA

Per valutare la multipotenza delle linee di OS-CSCs ottenute dal saggio delle sarcosfere, queste sono state indotte a differenziare in senso adipogenico. Tale differenziamento è stato ottenuto coltivando le diverse linee cellulari in terreno induttivo (AM, *Adipogenic Medium*), addizionato con dexametasone, insulina bovina e IBMX (Isobutilmetilxantina), tutti fattori necessari per indurre il differenziamento in senso adipogenico. Le cellule sono state mantenute in GM e in AM per 20 gg.

Per valutare l'esito del differenziamento i campioni sono stati fissati in formaldeide e successivamente colorati con Oil Red O. Colorante specifico per le gocce lipidiche. La presenza così rivelata delle vescicole lipidiche è stata osservata al microscopio ottico in campo chiaro.

I dati riportati per le linee OSA8-CSCs, rappresentativa delle linee OSAn-CSCs, per la linea OST-1-CSCs e per la linea SCO-1-CSCs. È stato osservato che tutte le linee di OS-CSCs sono risultate essere in grado di differenziare in senso adipogenico, mostrando a 20 gg dall'inizio dell'induzione la presenza di cellule non solo morfologicamente diverse, essendo più grandi ed estese, ma anche ricche di gocce lipidiche perinucleari (Figura 24).

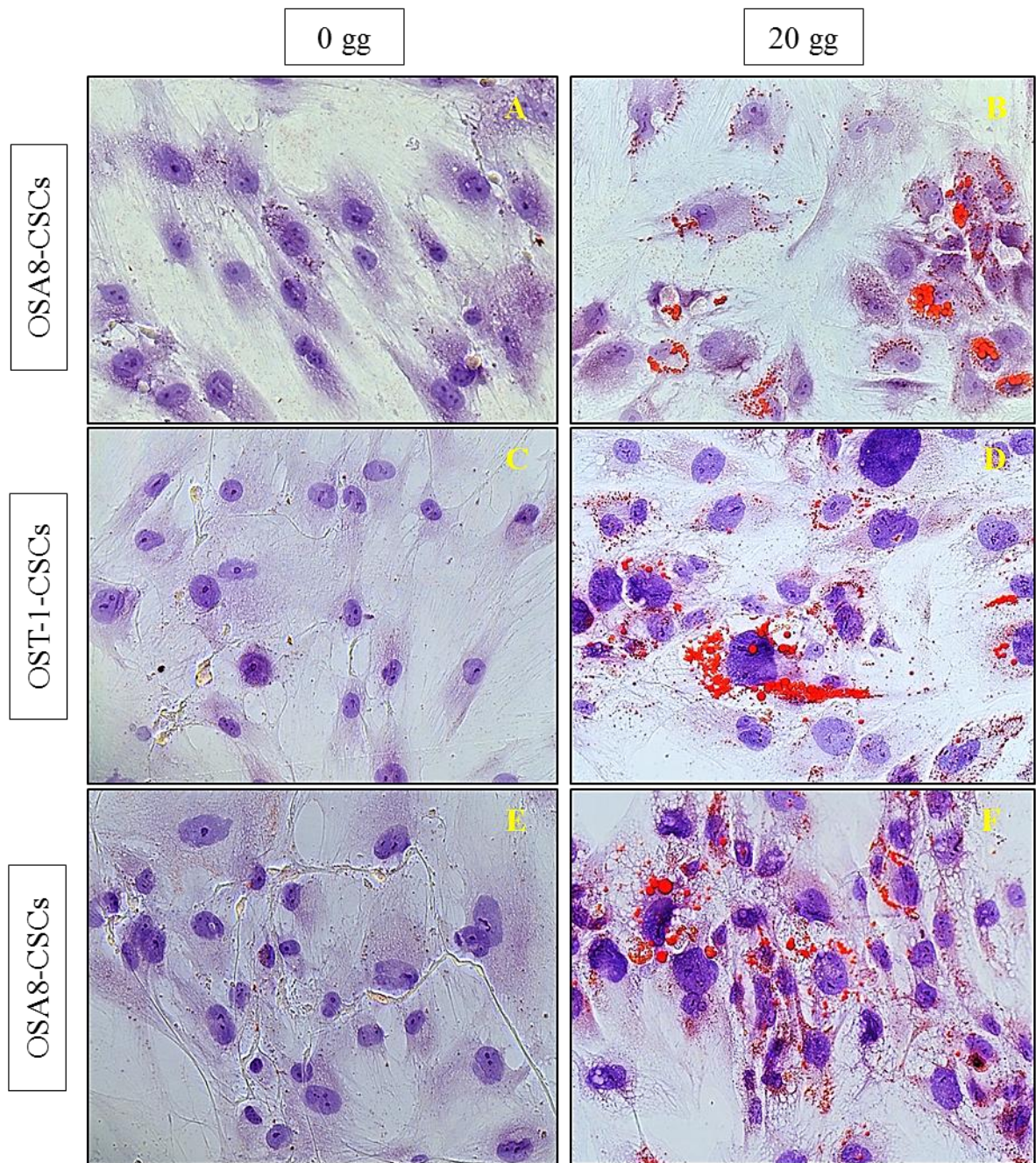


Figura 24. Differenziamento adipogenico valutato a 0 gg (A-C-E) e dopo 21 gg (B-D-F) di induzione mediante colorazione con OIL Red O. In rosso i vacuoli lipidici intracellulari e in azzurro i nuclei controcolorati con Ematossilina. Osservazione in campo chiaro. Obiettivo 40X

4.3.5. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA ALDEIDE DEIDROGENASI

Diversi recenti hanno mostrato che gli alti livelli di attività dell'enzima Aldeide Deidrogenasi (ALDH) sono una caratteristica caratteristica di diversi tumori (referenze), portando i ricercatori ad osservare come lo siano anche nelle CSCs. Questo ha reso la valutazione dei livelli di attività della ALDH un valido parametro non solo nella valutazione/identificazione del fenotipo staminale tumorale, ma anche nella prognosi della patologia neoplastica in esame. Il saggio sull'attività enzimatica della ALDH sulle linee di CSCs da noi isolate ha mostrato che le linee OSA8-CSCs, rappresentativa delle OSA-CSCs in generale, OST-1-CSCs e SCO-1-CSCs presentano alti livelli di attività enzimatica (Figura 25). Attività che, invece, è risultata essere scarsamente presente, quasi totalmente assente, nella linea cellulare di fibroblasti, siglata FIB48, utilizzata come controllo negativo in questo saggio. Inoltre, dal saggio è stato osservato che la linea OST-1-CSCs è risultata essere quella con più maggiore attività enzimatica.

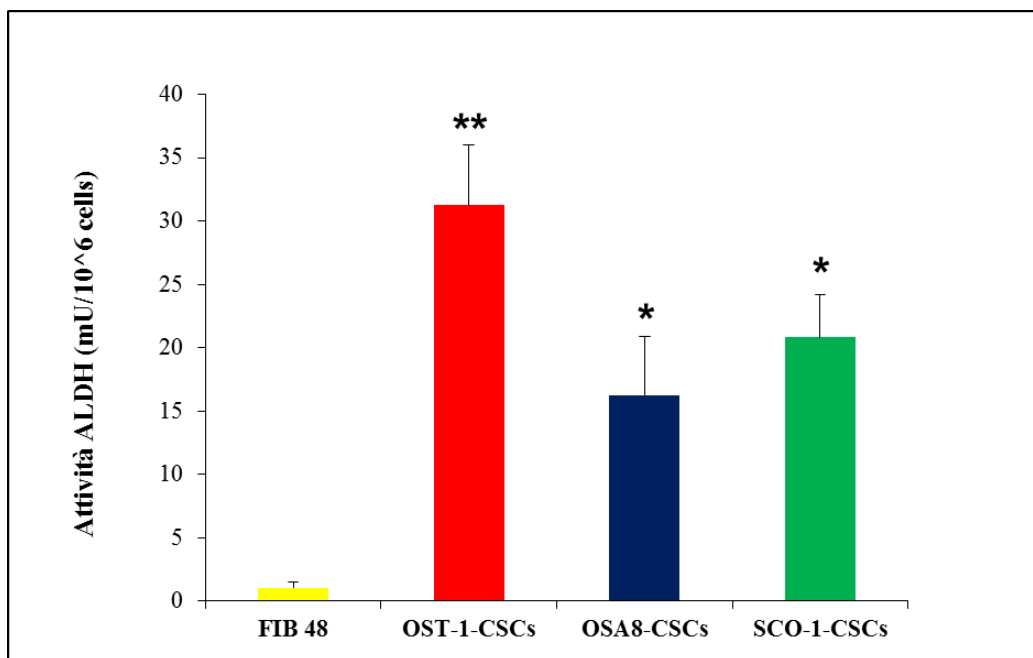


Figura 25. Il saggio sui livelli di attività dell'enzima ALDH ha messo in evidenza alti livelli di attività enzimatica nelle linee di OSA8-CSCs, OST-1-CSCs e di SCO-1-CSCs. Mentre, il saggio ha fatto registrare l'assenza di attività enzimatica nella linea finita e differenziata di fibroblasti, FIB48. Barre di errore: Dev. Std. . ** $p < 0.05$ vs FIB e * $p < 0.5$ vs FIB48.

4.3.6. ANALISI CITOFLUORIMETRICA DEL PROFILO DEI MARKER DI STAMINALITÀ MESENCHIMALE

Per valutare e confermare il fenotipo staminale tumorale delle linee cellulari isolate con il saggio delle sarcosfere, abbiamo eseguito analisi citofluorimetriche per lo studio dell'espressione degli antigeni che caratterizzano le cellule staminali mesenchimali adulte (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*). Le analisi sono state eseguite al P3 di subcoltivazione per le linee cellulari finite di OS e al P4 per le linee di CSCs isolate. Dato il gran numero di dati di seguito sono riportati: a) i dati di una sola linea cellulare finita di OS, siglata OSA8, quale rappresentativa di tutte le altre linee finite, b) i dati della linea di CSCs ottenuta dalla linea primaria OSA8, siglata OSA8-CSCs, come rappresentativa di tutte le linee di OSAn-CSCs isolate, e infine c) i dati della linea di SCO-1-CSCs, rappresentativi anche per la linea OST-1-CSCs. È stato osservato che tutti i campioni sono risultati essere totalmente negativi alla presenza del CD45 e del CD34 (Figura 26A, 27A e 28A). Le linee OSA8-CSCs e SCO-1-CSCs sono risultate essere altamente positive per il CD90, il CD44 e il CD105 (Figura 27B-C e Figura 28B-C). La linea primaria di OS, OSA8 ha mostrato una bassa positività al CD90 (16.3%), una bassissima positività al CD105 (2.4%) e solo un'alta positività al CD44 (range dal 83.4% al 97.4%) (Figura 26), essendo questo marcatore dei tessuti di origine mesenchimale, come è anche il caso dell'OS, essendo ritenuto un tumore ad origine mesenchimale.

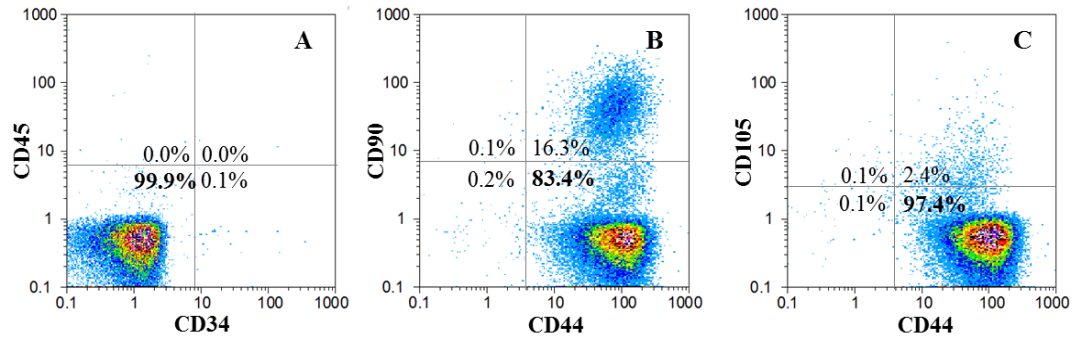


Figura 26. Espressione citofluorimetrica dei markers di staminalità mesenchimale nella linea finita OSA8.

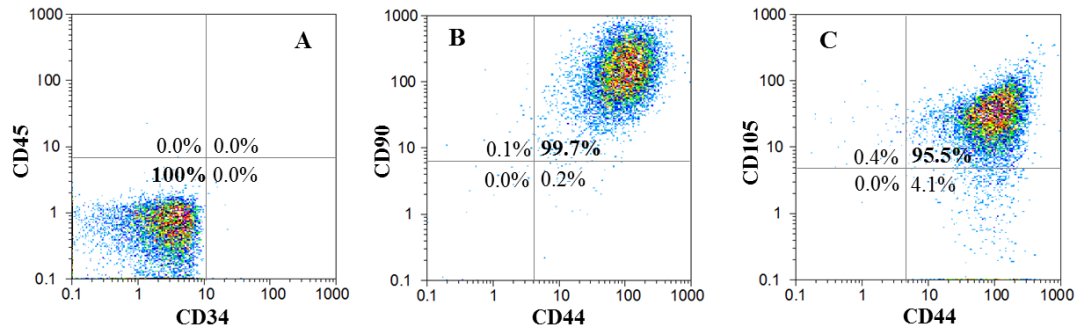


Figura 27. Espressione citofluorimetrica dei markers di staminalità mesenchimale nella linea OSA8-CSCs.

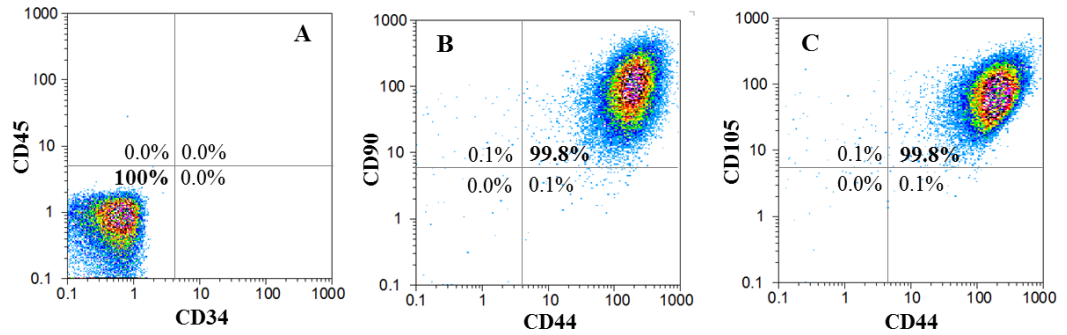


Figura 28. Espressione citofluorimetrica dei markers di staminalità mesenchimale nella linea SCO-1-CSCs.

4.3.7. ANALISI IN MICROSCOPIA CONFOCALE DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER DI STAMINALITÀ MESENCHIMALE, EMBRIONALE E TUMORALE

Per l'analisi dell'espressione dei marker di staminalità mesenchimale, le linee di OS-CSCs sono state coltivate in CSC-GM, in piastre da 24 pozzetti, fino al raggiungimento del 50% della confluenza in ciascun pozzetto, quando sono state fissate in formaldeide. Successivamente sono state permeabilizzate con RNasi e marcate con gli appositi anticorpi per la rilevazione di ciascun marker. Successivamente il citoscheletro e il nucleo sono stati opportunamente contro-colorato. I marcatori di staminalità analizzati sono stati: a) per la staminalità mesenchimale CD44, CD105 e Stro-1, b) per la staminalità embrionale Nanog, SOX2, Klf4 e POU5F1, e infine c) per il fenotipo staminale tumorale CD117 E CD133. Tutte le linee di OS-CSCs analizzate sono state osservate in LSCM (*Laser Scanning Confocal Microscopy*) con obiettivo 10X, inoltre sono state fatte osservazioni in 40X per alcuni dei marker più positivi, e in 63X per i marcatori nucleari. Di seguito sono riportati i risultati per la linea OSA8-CSCs, quale rappresentativa delle linee OSAn-CSCs, e i risultati per le linee SCO-1-CSCs e OST-1-CSCs. Le linee cellulari finite e differenziate di fibroblasti, siglata FIB48 e la linea di cellule di adenocarcinoma del colon, siglata HCT8, sono state utilizzate come controlli negativi.

4.3.7.1. CD44

L'espressione del CD44, come già osservato all'analisi citofluorimetrica è risultata altamente positiva in tutte e tre le linee cellulari, che hanno mostrato una distribuzione della proteina in buona parte della superficie cellulare, in particolare sui prolungamenti (Figura 28A-C). Il marcatore è risultato essere completamente assente nella linea FIB48, linea finita e differenziata (Figura 28D).

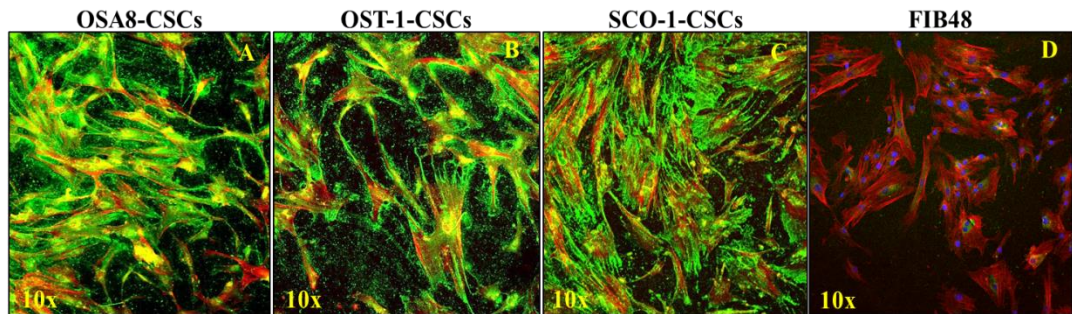


Figura 28. Espressione del marker CD44 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea FIB48 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; in blu i nuclei, controcolorati con Ioduro di Propidio (PI). Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x.

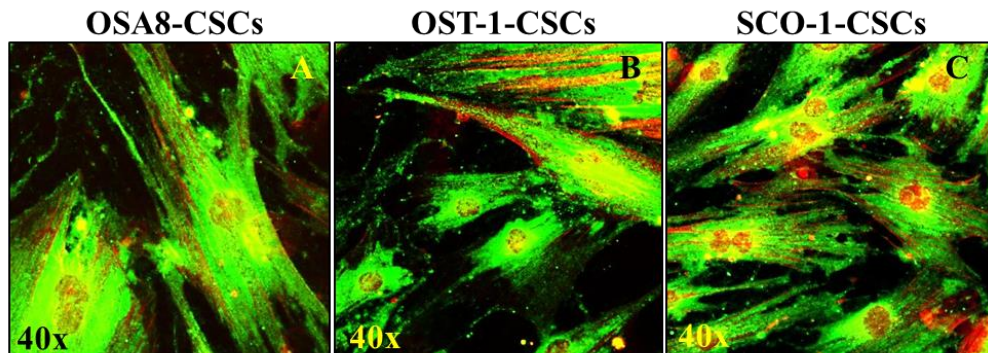


Figura 29. Espressione del marker CD44 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) con obiettivo 40X. Si nota nel dettaglio la distribuzione della proteina lungo gli assi del citoscheletro. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635;. Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 40x.

4.3.7.2. CD105

Anche l'espressione del CD105 è risultata positiva nella linea OSA8-CSCs e altamente positiva nelle linee OST-1-CSCs e SCO-1-CSCs. Le linee cellulari hanno mostrato nella maggior parte una distribuzione della proteina su tutta la superficie cellulare, tanto da non rendere visibile il citoscheletro, come si può osservare nella Figura 30, dove alcune cellule sono apparse essere più positive delle altre alla presenza del marcatore. Il marcatore è risultato essere completamente assente nella linea FIB48, linea finita e differenziata (Figura 30D).

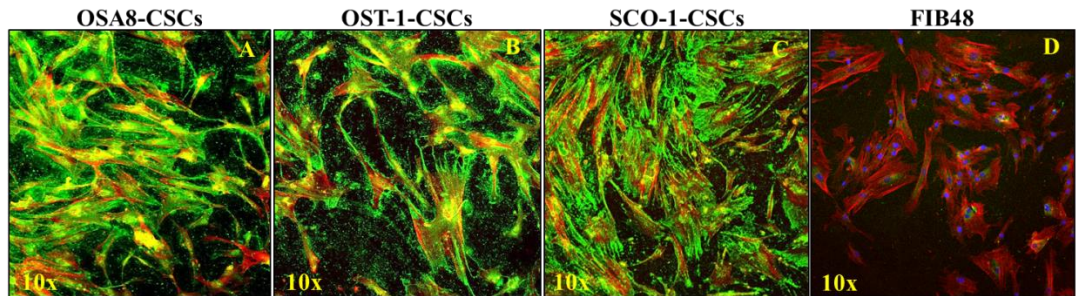


Figura 30. Espressione del marker CD105 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea FIB48 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; in blu i nuclei, controcolorati con Ioduro di Propidio (PI). Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x.

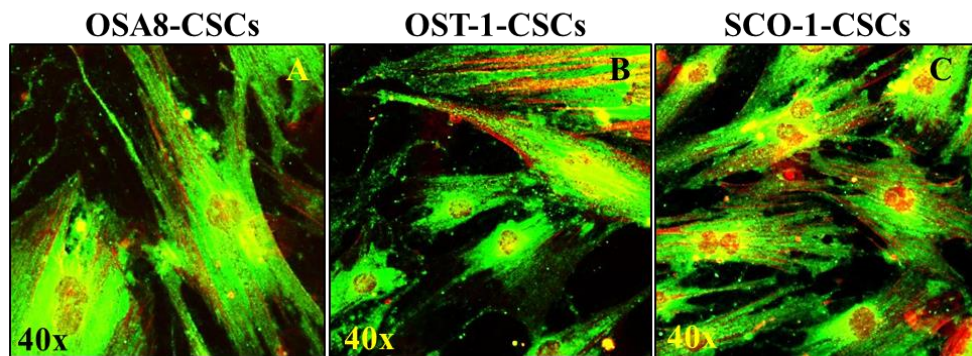


Figura 31. Espressione del marker CD105 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) con obiettivo 40X. quale controllo negativo. Si nota nel dettaglio la distribuzione della proteina lungo gli assi del citoscheletro. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635;. Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 40x.

4.3.7.3. STRO-1

L'espressione di STRO-1 è risultata essere moderata in tutte e tre le linee prese in esame. In entrambi ha mostrato una fluorescenza puntiforme e concentrata in alcuni punti della superficie cellulare, in particolare alle estremità (Figura 32). Il marcatore è risultato essere completamente assente nella linea FIB48, linea finita e differenziata (Figura 33D).

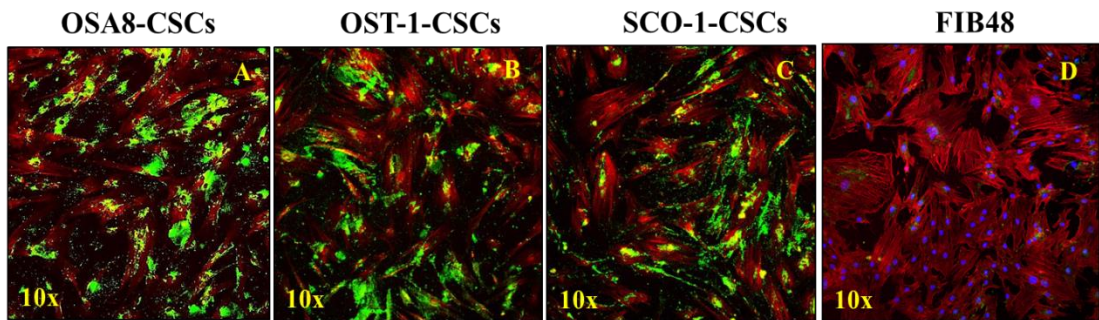


Figura 32. Espressione del marker Stro-1 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea FIB48 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; in blu i nuclei, controcolorati con Ioduro di Propidio (PI). Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x.

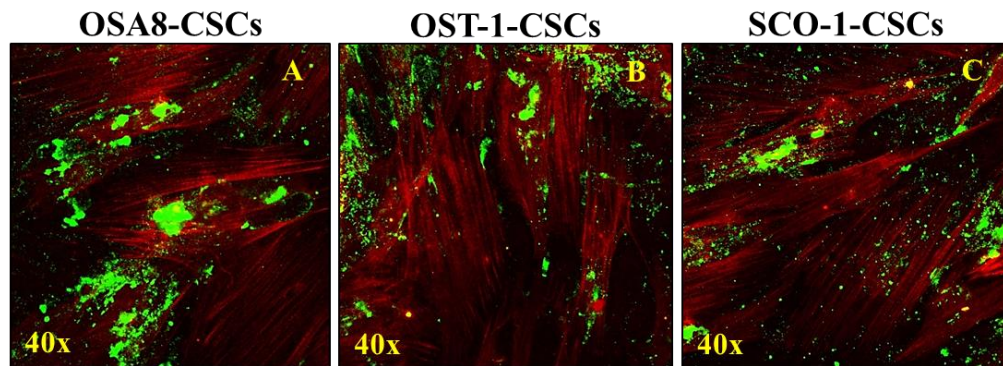


Figura 33. Espressione del marker Stro-1 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) con obiettivo 40X. Si nota nel dettaglio la distribuzione della proteina lungo gli assi del citoscheletro. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635;. Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 40x.

4.3.7.4. NANOG, SOX2, KLF4 E POU5F1

Nanog, SOX2, Klf4 e POU5F1 costituiscono il core trascrizionale responsabile del mantenimento del fenotipo staminale embrionale. Fenotipo che caratterizza le CSCs. Dalle analisi in immunofluorescenza è stato osservato che non solo tutte le linee di OS-CSCs analizzate di sono risultate essere positive (Figura 34A-C, 35A-C, 36A-C e 37A-C), ma anche che la loro localizzazione è a livello nucleare e perinucleare in ognuna di esse (Figure 34E, 35E, 36E e 37E). L'espressione di questi è invece risultata essere negativa sia per la linea HCT8 (Figura 34D, 35D, 36D e 37D).

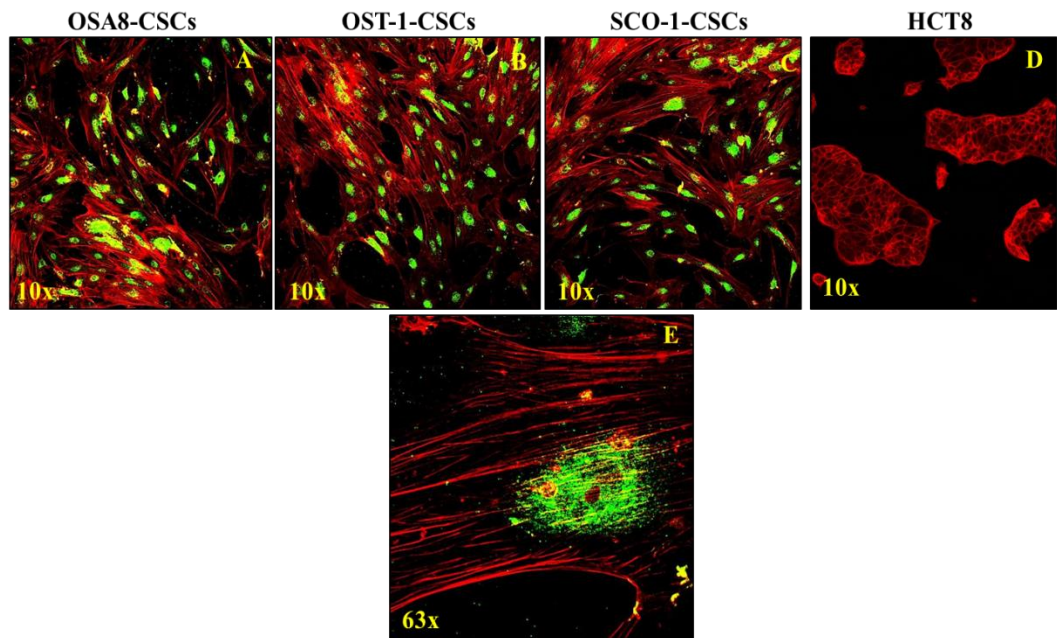


Figura 34. Espressione del marker Nanog nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea HCT8 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635. Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x. Dettaglio della localizzazione nucleare mediante osservazione con obiettivo 63X (E).

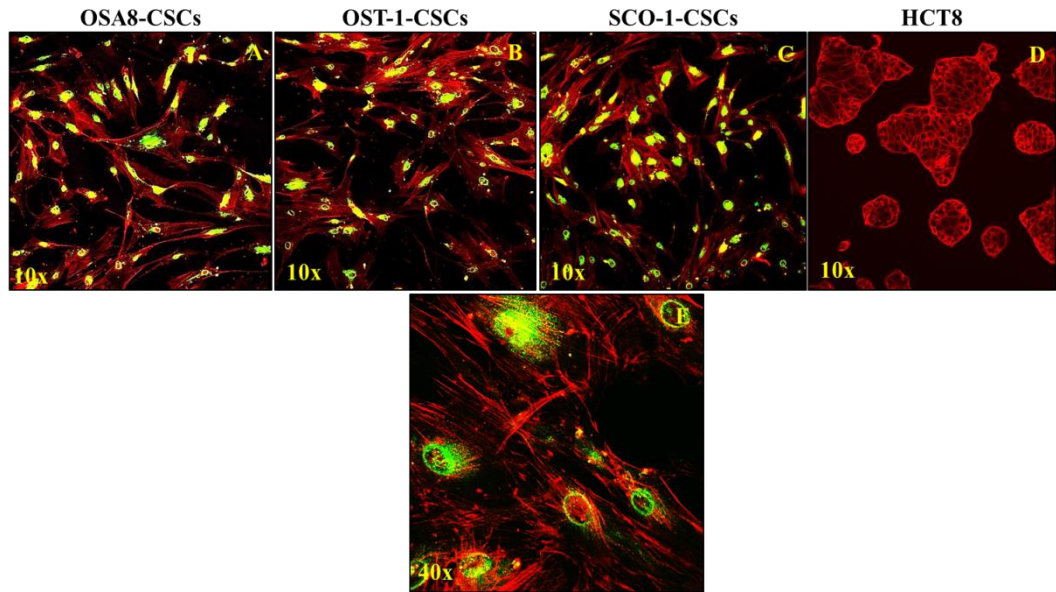


Figura 35. Espressione del marker Sox2 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea HCT8 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x. Dettaglio della localizzazione nucleare mediante osservazione con obiettivo 63X (E).

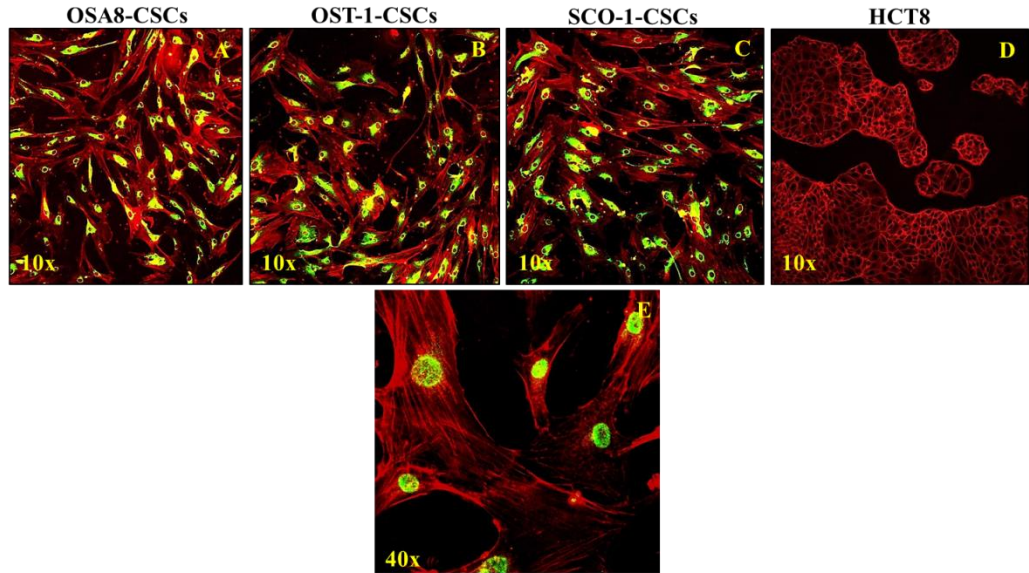


Figura 36. Espressione del marker POU5F1 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea HCT8 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x. Dettaglio della localizzazione nucleare mediante osservazione con obiettivo 40X (E).

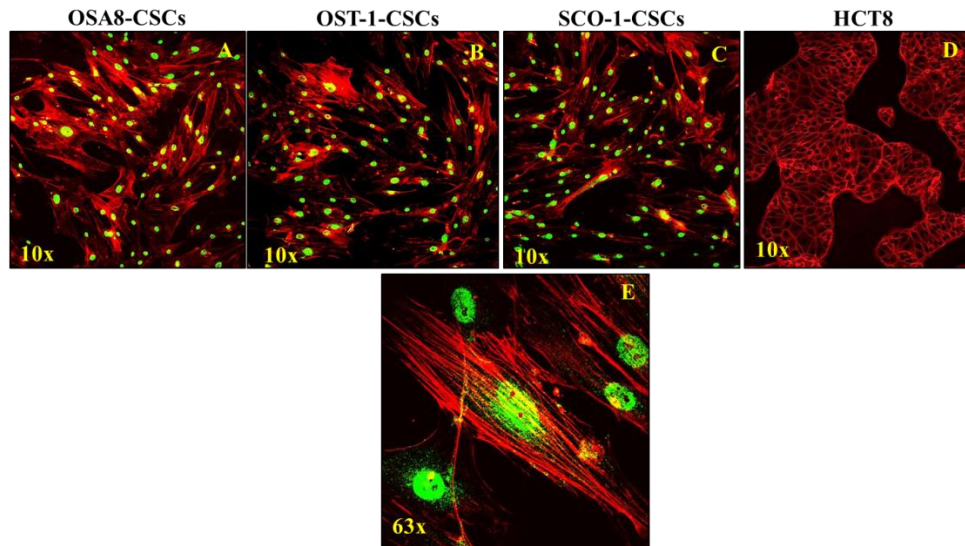


Figura 37. Espressione del marker KLF4 nelle tre linee cellulari di OS-CSCs (A-C) e nella linea HCT8 (D), quale controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x. Dettaglio della localizzazione nucleare mediante osservazione con obiettivo 63X (E).

4.3.7.5. CD117 E CD133

Per valutare ulteriormente il fenotipo di CSCs delle linee isolate dalle linee primarie di OS sono stati presi in esame due importanti marker delle CSCs, il CD117 e il CD133 (o PROM1). Dall'analisi in immunofluorescenza è stata osservata la loro presenza su tutte le linee di OS-CSCs isolate. Entrambi le proteine hanno mostrato una fluorescenza puntiforme diffusa su tutta la superficie cellulare, come si osserva in Figura 38A- B e in Figura 39 A-B, per la linea OSA8-CSCs, rappresentativa delle linee di OSAn-CSCs isolate, e per la linea SCO-1-CSCs. I dati alla linea OST-1-CSCs non sono riportati essendo stati analoghi a quelli della linea SCO-1-CSCs. Contemporaneamente le linee FIB48 e HCT8 sono risultate essere completamente negative alla loro presenza.

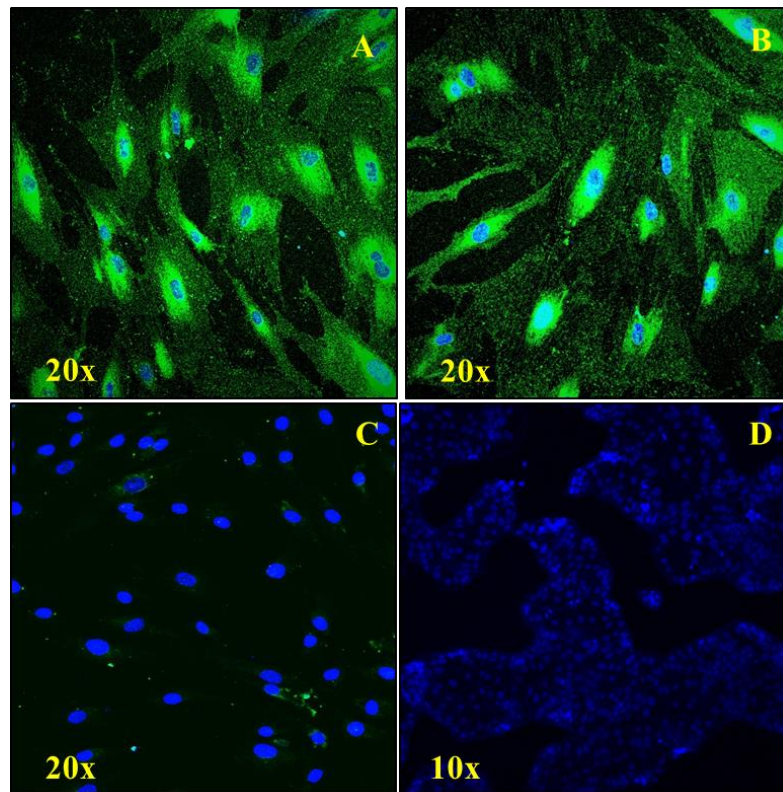


Figura 38. Espressione del marker CD117 nelle linee cellulari OSA8-CSCs (A) e SCO-1-CSCs (B), e nelle linee FIB48 (C) e HCT8 (D), quali controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; In blu i nuclei controcolorati con Ioduro di Propidio (Pi). Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x e 20X.

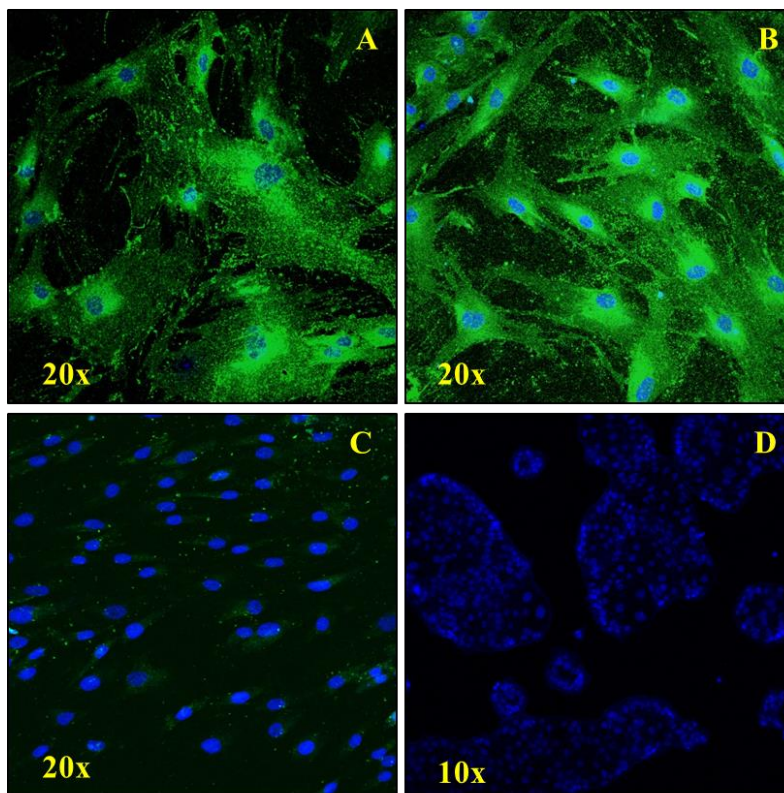


Figura 39. Espressione del marker CD133 nelle linee cellulari OSA8-CSCs (A) e SCO-1-CSCs (B), e nelle linee FIB (C) e HCT8 (D), quali controllo negativo. La fluorescenza perinucleare è data dall'auto-fluorescenza di fondo della formaldeide e/o da legame aspecifico dell'anticorpo. In verde l'anticorpo, marcato con Alexa Fluor 488. In rosso il citoscheletro, controcolorato con falloidina marcata con Alexa Fluor 635; In blu i nuclei controcolorati con Ioduro di Propidio (Pi). Osservazione in LSCM a colori convenzionali. Obiettivo 10x e 20X.

4.3.8. SECONDA GENERAZIONE DI SARCOsfERE

Per dimostrare la proprietà di autorinnovamento delle OS-CSCs isolate, queste sono state sottoposte al P4 di subcoltivazione, ad un secondo saggio di crescita in non adesione. Le cellule sono state mantenute in coltura in SGM, in piastre a bassa adesività per 28gg, tempo in cui si sono formate nuovamente delle sarcosfere (Figura 40) di dimensioni tali da poter essere isolate e trattate come precedentemente descritto. Saggio che ha dimostrato come nel tempo le popolazioni isolate dalla prima generazione di sfere siano in grado di mantenere la capacità di autorinnovarsi. Capacità fondamentale per le cellule staminali. Le linee cellulari isolate dal secondo saggio delle sarcosfere sono state siglate come OSA n -CSCs-II, dove n indica un numero progressivo da 1 a 14 per tutti i campioni testati.

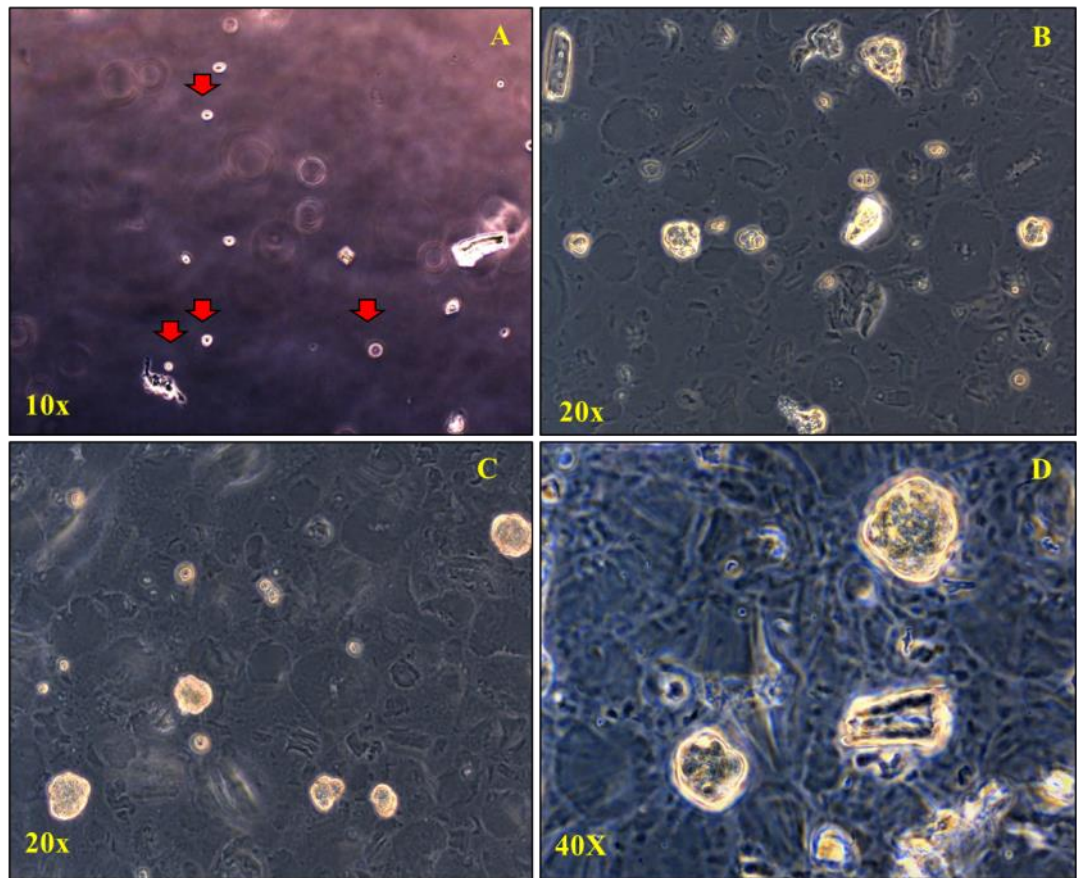


Figura 40. Osservazione in contrasto di fase con obiettivo 10X della seconda generazione di sarcosfere dalla linea OSA8-CSCs (A). Dopo 24 le cellule appaiono in sospensione e ben isolate (freccie rosse e nere). (B-C) sarcosfere formatesi a 7 e 14 giorni, e (D) sarcosfere formatesi a 21gg dalla semina in piastra a bassa adesività.

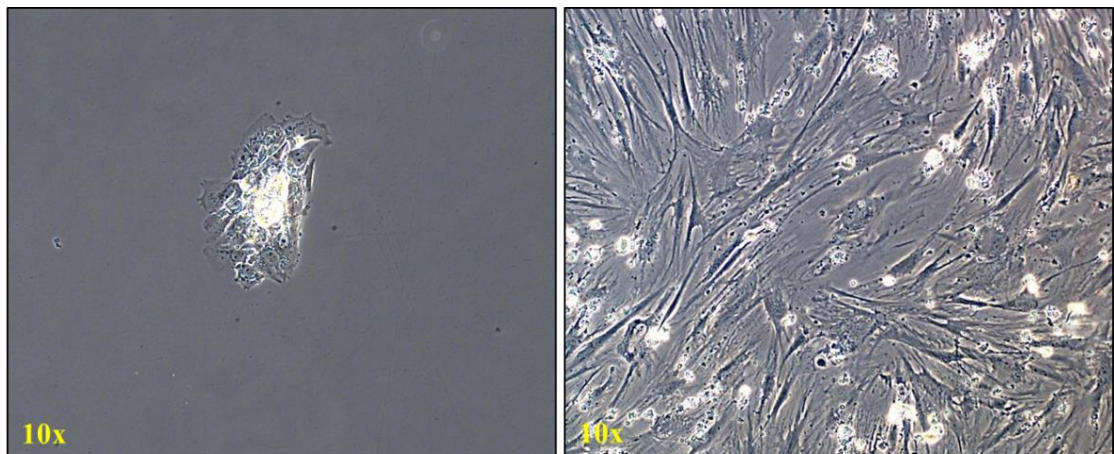


Figura 41. Osservazione in contrasto di fase con obiettivo 10X delle sarcosfere isolate e riseminate in condizioni di normale adesione. (A) sarcosfere a 24 h dall'isolamento e (B) a 7 gg dall'isolamento.

4.3.9. ESPRESSIONE DEI GENI DELLA STAMINALITÀ E DELLA TUMORIGENICITA'

Per valutare l'espressione dei geni che svolgono il ruolo principale nel mantenimento della staminalità e nella riprogrammazione cellulare (i.e. Nanog, Klf4, SOX2, POU5F1, LIN28A e REX1) e dei geni che caratterizzano le CSCs sono state allestite analisi di RT-PCR. Prima di procedere alla valutazione della loro espressione è stata valutata l'espressione del SATB2, quale marker dell'OS. Di tutti i campioni presi in esame sono, di seguito sono riportati i risultati relativi alle linee OST-1-CSCs, SCO-1-CSC e alla linea OSA8, presa come modello in rappresentanza delle altre linee di OSA. È stato osservato che l'espressione di questi geni risulta quasi assente nelle linee primarie OSA8, al contrario delle linee di CSCs che mostrano livelli di espressione qualitativamente superiori (Figura 42). In aggiunta è stata valutata anche l'espressione di PROM1 e di MYC, entrambi marker delle CSCs), e di AXL ed EZR (due geni fondamentali per la capacità di metastatizzare). Analogamente a quanto osservato per i geni della staminalità sopra indicati, anche per questi i livelli sono maggiori nelle linee di CSCs rispetto alla linea primaria (Figura 43).

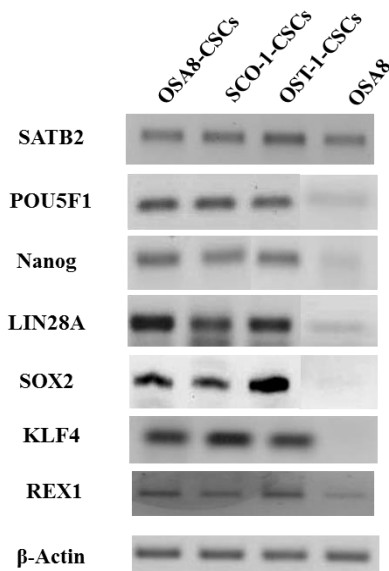


Figura 42. Espressione in PCR dei geni marker della staminalità embrionale e di SATB2.

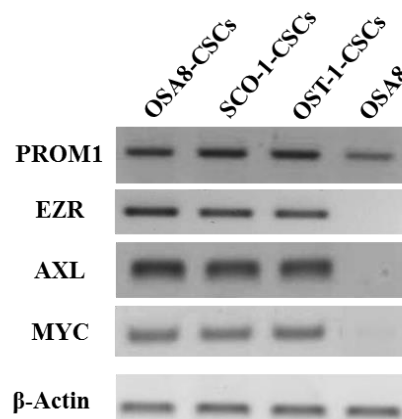


Figura 43. Espressione in PCR di geni marker del fenotipo tumorale.

5. DISCUSSIONE

L'OS è il tumore primitivo osseo più aggressivo. Questo tumore, che prende origine dal tessuto connettivo coinvolgendo le metafisi delle ossa lunghe nei bambini e nei giovani adulti, nonostante i trattamenti multidisciplinari con cui viene trattato, rimane ad oggi la seconda causa di morte per cancro nei bambini e nei giovani adulti [1-3]. La famiglia dell'OS comprende diverse tipologie, tra cui l'OS convenzionale (OSA), l'OS teleangectasico (OST) e l'OS a piccole cellule (SCO), sono le tre varianti ad alto grado di malignità, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni della diagnosi inferiore al 40% [4,5].

Negli ultimi anni, nel campo della ricerca oncologica, si è fatto strada il nuovo concetto di cellule staminali tumorali (CSCs, *Cancer Stem Cells*), da quando queste negli anni '90 sono state identificate e caratterizzate in diversi tumori [81-83]. Le CSCs sono una particolare sottopopolazione neoplastica, che, localizzata all'interno della massa tumorale primaria, è responsabile del mantenimento dell'omeostasi del tumore, del potenziale tumorale dello stesso e della protezione di questo dall'azione dei trattamenti chemio e radioterapici, essendo capaci di rimanere quiescenti (in fase G₀) e quindi non aggredibili dagli agenti chemio- e radioterapici che vanno a colpire le cellule in proliferazione. Queste caratteristiche, in relazione al loro fenotipo staminale, rappresentano una valida spiegazione al perché tumori come l'OSA, lo SCO e l'OST presentino nonostante le aggressive terapie una prognosi negativa.

Le CSCs dopo essere state identificate nella leucemia mieloide acuta, sono state trovate anche in altri tumori solidi, tra cui i sarcomi ed in particolare i sarcomi ossei [96-99]. L'identificazione di questa particolare popolazione di cellule tumorali nei sarcomi ha permesso l'inizio di una ricerca oncologica nuova, basata sullo studio dei meccanismi alla base della resistenza alle terapie da parte di questo tumore osseo. Conseguentemente a questo abbiamo deciso di investigare la presenza delle CSCs nell'OSA, nell'OST e nello SCO.

Avendo avuto la possibilità di ottenere diversi tessuti bioptici umani di OSA, di OST e di SCO, siamo stati in grado di isolare da ciascuno una linea cellulare finita, siglata come OSA_n (n, numero progressivo ad indicare le linee di OSA), una linea cellulare finita di OST, siglata come OST-1, e infine una linea cellulare finita di SCO, siglata come SCO-1. Dopo aver osservato in tutte le diverse tipologie di linee cellulari finite di OS, una forte espressione del gene marker del differenziamento osteoblastico, SATB2, si è proceduto alla studio della staminalità in ciascuna delle linee finite di OS. Sulla base di quanto riportato da Gibbs *et al.* [93], in relazione alla possibilità di isolare le CSCs, utilizzando la capacità delle CSCs di crescere in condizioni di non adesione, abbiamo isolato, grazie ad un sistema basato sull'utilizzo di camere filtranti [94], da ciascuna linea tumorale, un linea di OS-CSCs, rispettivamente. Linee che sono state siglate come OSA_n-CSCs, per quelle isolate dalle linee finite di OSA, come OST-1-CSCs nel caso dell'OST e come SCO-1-CSCs nel caso dello SCO., studiando per tutte le linee elencate sia il fenotipo mesenchimale sia il fenotipo embrionale [44]. È stato osservato che al P4 di subcoltivazione, tutte le linee di CSCs mantengono la proprietà di autorinnovarsi, in quanto sottoposte ad un secondo saggio di crescita in non adesione hanno mostrato nuovamente la formazione di sfere cellulari. Sfere che una volta isolate e messe in piastra hanno dato origine ad una seconda popolazione di cellule staminali tumorali, siglata come OSA_n-CSCs-II, OST-1-CSCs-II e SCO-1- CSC-II. Gli esperimenti di differenziamento a cui le CSCs sono state sottoposte hanno confermato la capacità di tutte le linee a differenziare in osteoblasti e in adipociti, come fanno anche le staminali mesenchimali adulte (MSCs, *Mesenchymal Stem Cells*). Il fenotipo staminale mesenchimale è stato anche confermato dalla valutazione del tasso clonogenico per ciascuna linea di CSCs, e dai dati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica che ha messo in evidenza l'elevata espressione fenotipica di specifici marker di superficie, quali CD44, CD105 e CD90, riconosciuti essere marcatori delle MSCs. L'analisi citofluorimetrica ha inoltre evidenziato l'assenza dei marker CD34 e CD45, marker tipici del fenotipo staminale ematopoietico.

Oltre all'analisi citofluorimetrica, abbiamo anche analizzato l'espressione fenotipica di CD44, CD105 e Stro-1, in immunofluorescenza.

I risultati ottenuti hanno mostrato un'elevata positività in tutte le tipologie di CSCs analizzate dei marker CD44 e CD105, e la moderata positività a Stro-1, un altro dei marker caratteristici delle MSCs. Sempre in immunofluorescenza è stata valutata l'espressione di CD133 e di CD117, due marker delle CSCs, a cui tutte le linee sono risultate essere positive.

Per quanto riguarda lo studio del fenotipo embrionale è stata analizzata in immunofluorescenza la presenza dei marker specifici del fenotipo embrionale (i.e. Nanog, Sox2, Klf4 e POU5F1), che sono risultati essere presenti a livello nucleare e perinucleare in tutte le linee di CSCs [100-108]. Contemporaneamente è stata valutata l'espressione genica degli stessi in aggiunta all'espressione di altri due geni marker della staminalità embrionale quali REX1 e LIN28A. Valutando l'espressione genica è stato osservato che questi geni scarsamente o quasi totalmente assenti nelle linee cellulari finite di OS, sono altamente espressi nelle linee di CSCs isolate. Siccome le popolazioni di CSCs sarebbero responsabili della resistenza alle chemioterapie, è stata valutata l'attività dell'enzima Aldeide Deidrogenasi 1 A1 (ALDH1A1), dimostrando l'elevata presenza nella popolazione di CSCs di tale enzima [109].

Inoltre il fenotipo tumorale è stato confermato dallo studio dell'espressione genica non solo del gene CD133 (o PROM1), ma anche del gene MYC e dei geni AXL ed EZR, che sono stati negli ultimi anni identificati quali geni responsabili del potenziale tumorale di queste cellule, essendo responsabili della regolazione del processo invasivo e metastatico [110,111]. A tal proposito abbiamo valutato la capacità delle CSCs isolate di formare colonie in soft agar. Importante saggio *in vitro* per testare l'abilità invasiva delle CSCs, che hanno dimostrato di essere dotate di tale proprietà, che è invece assente nelle MSCs.

6. CONCLUSIONI

Per lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie contro l'OSA, l'OST e lo SCO, tutte ad alto grado di malignità con una prognosi negativa, è necessario non solo conoscere le origini di queste patologie, ma anche comprendere quali sono i meccanismi interni responsabili della formazione di recidive o metastasi. La scoperta del cluster delle CSCs all'interno dei tumori ha aperto la strada agli studi relativi ai possibili meccanismi di resistenza alle terapie. Pertanto, lo scopo principale di questo studio è stato di dimostrare la presenza della staminalità all'interno di tre delle varianti più aggressive dell'OS. In questo studio sono state collezionate e stabilite linee cellulari finite umane di OSA, di OST e di SCO, da cui sono state rispettivamente caratterizzate, le CSCs. Cellule che sono state per la prima volta studiate sia a livello dell'OST sia dello SCO.

In conclusione, lo studio presentato vuole essere il primo passo importante nello studio *in vitro* della biologia e dei meccanismi molecolari legati al fenotipo delle CSCs in queste tipologie di OS ad alto grado di malignità, con lo scopo principale di identificare nuovi biomarcatori molecolari legati alle CSCs. Ad oggi questi sono rappresentati dalla grande famiglia dei piccoli RNA non codificanti, tra cui troviamo i microRNA (miRNA), gli small interfering RNA (siRNA) ecc. Diversi studi hanno infatti dimostrato non solo la loro importanza nel mantenimento della staminalità dei tumori e nel loro sviluppo, ma anche la possibilità di essere utilizzati come strumento contro il cluster di CSCs. Alla luce di tutto questo abbiamo stabilito modelli cellulari di CSCs per ciascuna delle forme più rare ed aggressive di OS per studiarne la biologia con la speranza futura di aprire la strada allo sviluppo di terapie più efficaci contro queste tre tipologie di OS, ancora non troppo studiate.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Reddick, R.L., Micheliteh, H. J., Levine, A.M., & Triche, T.J. Osteogenic Sarcoma. A study of the ultrastructure. *Cancer*. 45 (1), 64-71 doi: 10.1002/1097-0142(19800101) (1980).
2. Gatta, G., Capocaccia, R., Stiller, C., Kaatsch, P., Berrino, F., Terenziani, M.; EURO CARE Working Group. Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. *J. Clin. Oncol.* 23 (16), 3742-51, 2005.
3. Olstad, O.K. et al. Molecular heterogeneity in human osteosarcoma demonstrated by enriched mRNAs isolated by directional tag PCR subtraction cloning. *Anticancer. Res.* 23 (3B): 2201-16 (2003).
4. Geller, D. S., & Gorlick, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 8 (10),705-718, 2010.
5. Tang, N., Song, W.X., Luo, J., Haydon, R.C., & He T.C. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466 (9), 2114-30 doi: 10.1007/s11999-008-0335-z, 2008.
6. Friedman, M. A., Carter, S. K.. “The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts to the future”. *Journal Surgery Oncology*, 4:482-510, 1972.
7. Rosen, G., Marcove, R.C., Caparros, B., Nirenberg, A., Kosloff, C., Huvos, A.G. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*. 43(6):2163-77, 1979.
8. Gorlick, R et al. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin. Cancer Res.* 9 (15), 5442-53, 2003.
9. Hayden, J.B. & Hoang, B.H. Osteosarcoma: basic science and clinical implications. *Orthop. Clin.North Am.* 37 (1), 1-7 doi: 10.1016/j.ocl.2005.06.004, 2006.
10. Thomas, D.M. et al. Epigenetics modifications in osteogenic differentiation and transformation. *J. Cell. Biochem.* 98 (4), 75769 doi: 10.1002/jcb.20850, 2006.
11. Meyers, P. A, Gorlick, R. “Osteosarcoma”. *Pediatrics Clinic of North America*. 44:973-989, 1997.

12. Bielack, S. S, Kempf-Bielack, B., Delling, G., et al. "Prognostic factors in high grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1, 702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols". *Journal Clinical Oncology*, 20:776-90, 2002.
13. :Ross, J. A, Spector, L. G., Davies, S. M. "Childhood cancer etiology: recent reports". *Pediatric Blood & Cancer* . 45(3):239-41, 2005.
14. Picci, P., Ferrari, S., Bacci, G., et al. "Treatment recommendations for osteosarcoma and adult soft tissue sarcomas". *Drugs*. 47:82-92, 1994.
15. Kempf-Bielack, B., Bielack, S. S., Jurgens, H., et al. Osteosarcoma relapse after combined multimodality therapy: an analysis of unselected in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS)". *Journal Clinical Oncology*. 23:559-68, 2005.
16. Paget, J. *Lectures on Surgical Pathology*; Philadelphia, Lindsay & Blackiston, 1854.
17. Gaylord, H.R., On the pathology of so-called bone aneurism. *Ann Surg*. 37:834-47, 1903.
18. Jacobson, S.A., Malignant aneurysmal bone cyst. *Bull Pathol*, 10:240-241, 1969.
19. Ewing, J. A review and classification of bone sarcomas. *Arch Surg*. 4:485-533, 1922.
20. Ewing, J. A review of the classification of bone tumors, *Bull Am Coll Surg*. 24:290-295, 1939.
21. Yarmish, G., Klein, M.J., Landa, J., Lefkowitz, R.A., Hwang, S. Imaging characteristics of primary osteosarcoma: nonconventional subtypes. *Radiographics*. 30(6):1653-1672, 2010.
22. Turel, M.K., Joseph, V., Singh, V., Moses, V., Rajeshkar, V. Primary telangiectatic osteosarcoma of the cervical spine. *J Neurosurg Spine*. 16(4):373-378, 2012.
23. Alves, F.A., Lopes, M.A., Ikeda, M.K., Kowalski, L.P., Almeida, O.P. Oral metastasis of telangiectatic osteosarcoma. *Oral Dis*. 9(2):104-106, 2003.
24. Bloem, J.L., Kroon, H.M. Osseous lesions. *RadiolClin North Am*. 31(2):261-78, 1993.

25. Seeger, L.L., Gold, R.H., Chandnani, V.P., Diagnostic imaging of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 270:254-263, 1991.
26. Dorfman, H., Bogdan, C. *Bone Tumors.* St.Louis, MO: Mosby, 1998.
27. Sternberg, S., *Diagnostic Surgical Pathology.* Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 1999.
28. Matsuno, T., Unni, K.K., McLeod, R.A., Dahlin, D.C. Telangiectatic osteogenic sarcoma. *Cancer.* 38:2538-2547, 1976.
29. Liu, J.J., Liu, S., Wang, J.G., Zhu, W. et al. Telangiectatic osteosarcoma: a review of literature. *OncoTargets and Therapy.* 6: 593-602, 2013.
30. Dahlin, D. C., Unni. K. K. "General aspects and data on 11087 cases. 5th Edition Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1996.
31. Nakajima, H., Sim, F. H., Bond, J. R., Unni, K. K.. "Small cell osteosarcoma of bone". *Cancer.* 79(11):2095-106. 1997.
32. Ayala, A. G., Roy, J.Y., Raimond, A. K., et al. "Small cell osteosarcoma: a clinicopathologic study of 27 cases". *Cancer.* 64:2162-73, 1989.
33. Dickersin, G. R. and Rosenberg A. E. "The ultrastructure of small-cell osteosarcoma, with a review of the light microscopy and differential diagnosis. *Human Pathology.* 22:267-75, 1991.
34. Park, S.H., Kim I. "Small cell osteogenic sarcoma of the ribs: cytological, immunohistochemical and ultrastructural study with literature review". *Ultrastructural Pathology.* 23:133-40, 1999.
35. Hameed, M.. "Small round cell tumors of bone". *Archives of pathology & laboratory medicine.* 131(2):192-204, 2007.
36. Righi, A., Gambarotti, M., Longo S., et al. "Small cell osteosarcoma. Clinicopathologic, Immunohistochemical, and molecular analysis of 36 cases". *The American Journal of Surgical Pathology.* 39:691-699, 2015.

37. Machado, I., Alberghini M, Giner, F., et al. "Histopathological characterization of small cell osteosarcoma with immunohistochemistry and molecular genetic support. A study of 10 cases". *Histopathology* . 57:162-167, 2010.
38. . Kaste, C., Pratt, C. B., Cain, A. M. et al. "Metastases detected at the tim of the diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features". *Cancer*. 86:1602-1608, 1999.
39. Jeffree, G. M., Price, C. H., Sissons, H. A.. "The metastatic patterns of osteosarcoma". *British Journal of Cancer*. 32:87-107, 1973.
40. Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B, et al. "Cancer stem cells-Perspective on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells". *Cancer Research*. 66, 9939-9344, 2006.
41. . Magee, J. A, Piskounova, E. and Morrison, S. J.. "Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty". *Cancer Cell*. 21:283-96, 2012.
42. Baylin, S. B. and Jones, P. A.. "A decade of exploring the cancer epigenome- biological and translational implications". *Nature Review, Cancer*. 11:726-734, 2011.
43. Charles, N., Ozawa, T., Squatrito, M., et al. "Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells". *Cell Stem Cell*. 6:141-152.
44. Dela Cruz, F. S. "Cancer stem cells in pediatric sarcomas". *Frontiers in oncology*. 3:168, 2013.
45. Clevers, H.. "The cancer stem cell: premises, promises and challenges". *Nature Medicine*. 17:313-319, 2011.
46. Igor EK.The Man behind the Unitarian Theory of Hematopoiesis. *Perspect Biol Med.*; 43:269-76, 2000.
47. Rajnish Jumar, Anju Sharma, Ashok Kumar Pattnaik, and Kumar Varadwaj. Stem cells: An overiview with respect tocardiovascular and renal disease. *J Nat Sci Biol Med*. Jul-Dec; 1(1): 43-52, 2010.
48. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of stemness. *Exp Hematol*. 32:585-598, 2004.

49. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 51:1-28, 2004.
50. Morrison S.J., Shah N. M., Anderson D.J., Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.*; 88(3):287-98, 1997.
51. Lovell-Badge, R. The future for stem cell research. *Nature.* 414(6859):88-91, 2001.
52. Becker, A.J., McCulloch, E.A., Till, Je. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963 Feb 2; 197; 452-4.
53. Waldmann, H. Therapeutic approaches for transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2001;13(5):606-10.
54. Zhu, M., Heydarkhan-Hagvall, S., Hedrick, M., Benhaim, P., Zuk, P. Manual Isolation of Adipose-derived Stem Cells from Human Lipoaspirates. *J. Vis. Exp. (79)*, e50585, doi:10.3791/50585, 2013.
55. Gage, F.H. and Fisher, L.J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu.Rev.Neurosci.* 18: 159, 1995.
56. McKay, R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 276(5309):66- 71, 1997.
57. Alison, M. and Sarraf, C. Hepatic stem cells. *J.Hepatol.* 29: 676, 1998.
58. Bonner-Weir, S., Sharma, A. Pancreatic stem cells. *J Pathol.* Jul;197(4):519- 26, 2002.
59. Otto WR. Lung stem cells. *Int J Exp Pathol.* 1997 Oct;78(5):291-310.
60. Foster CS, Dodson A, Karavana V, Smith PH, Ke Y. Prostatic stem cells. *J Pathol.* Jul;197(4):551-65, 2002.
61. Al-Awqati, Q. and Oliver, J.A. Stem cell in the Kidney. *Kidney Int.* 61: 387- 395, 2002.
62. Welm, B., Behbod, F., Goodell, M.A., Rosen, J.M. Isolation and characterization of functional mammary gland stem cells. *Cell Prolif.* Oct;36 Suppl 1:17-32, 2003.

63. De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, Gasparotto L, Piccoli M, Taiani, et al. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol.* 177(1): 369-76, 2007.
64. Pipino, C., Shangaris, P., Resca, E., Zia, S., Deprest, J., Sebire, N.J., et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? *Br Med Bull.* 105:43-68, 2013.
65. Moise KJ Jr. Umbilical cord stem cells. *Obstet Gynecol.* Dec;106(6):1393- 407, 2005.
66. Markov, V., Kusumi, K., Tadesse, M.G., William, D.A., Hall, D.M., Lounev, V., et al. Identification of cord blood- derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cells Dev.* 16(1): 53-73, 2007.
67. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 418: 41-49, 2002.
68. Prockop DJ. Marrow stromal cell as stem cells for nonhemopoietic tissues. *Science.* 276: 71-74, 1997.
69. Friedestein AJ., Gorskaja JF., Kulagia NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs. *Exp Hematol.* 4: 267-274, 1976.
70. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J., Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation, capacity, immunological features, potential for homing. *Stem Cells.* 25, 2739-2749, 2007.
71. Simmons, P.J. and Torok-Storb, B., Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 78, 55-62, 1991.
72. Majumdar, M.K, Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., Mosca, J.D. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 10(2): 228-241, 2003.

73. Vogel, W., Grünebach, F., Messam, C.A., Kanz, L., Brugger, W., Bühring, H.J. Heterogeneity among human bone marrow derived mesenchimal stem cells and neural progenitors. *Haematologica*. 88(2):126-132, 2003.
74. Nagano, S. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* Dec 204 vol. 95 n°12, pp 930-935.
75. Rege T.A.; Hagood J.S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*. 20 (8): 1045-1054, 2006.
76. J. A. Thomson and V. S. Marshall, *Curr. Top. Dev. Biol.*38, 133 (1998). ^[1]_{SEP}
77. Martin F. Pera, Benjamiin Reubinoff and Alan Trounson. Human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* 113, 5-10, 2000.
78. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336(6200):688-90, 1988.
79. Clarke, M.F. et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer. Res.* 66 (19), 9339-44 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126, 2006.
80. Lapidot, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukeamia after transplantation into SCID mice. *Nat.* 367 (6464), 645-8, 1994.
81. Bonnet, D., Dick. J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3 (7), 730-7 doi:10.1038/nm0797-730, 1997.
82. Visvader, J.E. & Linderman, G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer.* 8 (10), 755-68 doi: 10.1038/nrc2499, 2008.
83. Bapat, S.A. Evolution of cancer stem cells. *Sem. Cancer Biol.* 17 (3), 204-13 doi:10.1016/j.semcancer.2006.05.001, 2007.

84. Rubio, D. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer. Res.* 65 (8), 3035-9, 2005.
85. Burns, J.S., Abdallah, B.M., Guldborg, P., Rygaard, J., Schrøder, H.D., Kassem, M. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer. Res.* 65 (8), 3126-35, 2005.
86. Zhang, M. & Rosen, J.M. Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16 (1), 60-4 doi: 10.1016/j.gde.2005.12.008, 2006.
87. Ma, S., Lee, T.K., Zheng, B.J., Chan, K.W. & Guan, X.Y. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene.* 27 (12), 1749-58 doi:10.1038/sj.onc.1210811, 2008.
88. Wu, C. et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer. Res.* 67 (17), 8216-22 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0999, 2007.
89. Ma, I. & Allan, A.L. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem. Cell. Rev.* 7 (2), 292-306 doi: 10.1007/s12015-010-9208-4, 2011.
90. Awad, O. et al. High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLoS One.* 5 (11), e 13943 doi: 10.1371/journal.pone.0013943, 2010.
91. Fujii, H., Honoki, K., Tsujiuchi, T., Kido, A., Yoshitani, K. & Takakura, Y. Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 34 (5), 1381-6 doi:10.3892/ijo_00000265, 2009.
92. Di Fiore, R. et al. Genetic and molecular characterization of the human osteosarcoma 3AB-OS cancer stem cell line: a possible model for studying osteosarcoma origin and stemness. *J. Cell. Physiol.* 228 (6), 1189-201 doi: 10.1002/jcp.24272, 2013.
93. C. P. Gibbs et al. "Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis". *Neoplasia.* 7 (11), 967-76, 2005.

94. Palmi, G., Zonefrati, R., Mavilia, C., Aldinicc, A., Luzi, E., Marini, F., et al. Establishment of cancer stem cell cultures from human conventional osteosarcoma. *J Vis Exp.* (116), e53884, doi:10.3791/53884, 2016.
95. Mullis, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris).* 48(8):579-82. 1990.
96. P. Dalerba, S. J. Dylla, I. K. Park, et al. "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells". *Proc Natl Acad Sci.* 104(24):10158-63, 2007.
97. A. T Collins, P. A. Berry, C. Hyde, et al. "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells". *Cancer Research.* 65:10646-10951, 2005.
98. C. LI, D. G. Heidt, P. Dalerba, et al. "Identification of pancreatic cancer stem cells". *Cancer Research.* 67:1030-1037, 2007.
99. C. F. Kim, E. L. Jackson, A. E. Woolfenden, et al. "Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and in lung cancer. *Cell*". 121:823-835, 2005.
- 100.S. Sell. "Stem cell origin of cancer and differentiation therapy". *Critical Reviews in Oncology and Hematology.* 51:1-28, 2004.
- 101.R. T Oliver. "Germ cell cancer" *Current Opinion in Oncology,* 11:236-241,1999.
- 102.K. Takahashi, T. Ichisaka and S. Yamanaka. "Identification of genes involved in tumor-like properties of Embryonic Stem cells". *Methods in molecular biology.* 329:449-58, 2006.
- 103.I. Carmel-Gross, N. Bollag, L. Armon and A. Urbach. "LIN28A: a stem cell factor with a key role in pediatric tumor formation". *Stem Cells and Development.* 25:367-377, 2016.
- 104.K. Adachi, H. Suemori, S.Y Yasuda, et al. "Role of Sox2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells". *Genes Cells.* 15:455-70, 2010.
- 105.L. H. J. Looijenga, H. Stoop, P. J. C. Hubert, et. al."POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors". *Cancer Research.* 63:2244-2250, 2003.

- 106.S. Gong, Q. Li, C. R. Jeter, et al. "Regulation of NANOG in cancer cells". *Molecular Carcinogenesis*. 54(9):679-87, 2015.
- 107.I. Ma and A. L. Allison. "The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and in cancer stem cells". *Stem Cell Rev and Rep*. 7:292-306, 2011.
- 108.A. S. Adhikari, N. Agarwal, B. M. Wood, C. Porretta and B. Ruiz. "CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor initiating cells associated with metastasis and drug resistance". *Cancer Research*. 70:4602-4612, 2010.
- 109.K. W. Hunter. "Ezrin, a key component in tumor metastasis". *Trends in Molecular Medicine*. 10(5):201-204, 2004.
- 110.M. Brown, J. R. M Black, R. Sharma, et al. "Gene of the month: Axl". *Journal Clinical Pathology*. 2016.
- 111.T. A. Martin, G. Harrison, R. E. Mansel and W. G. Jiang. "The role of CD44/ezrin complex in cancer metastasis". *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 46:165-186, 2003.