



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

VALUTAZIONE DELLA CHEMIORESISTENZA AL CISPLATINO IN
CELLULE STAMINALI TUMORALI DEL CAVO ORALE:
NUOVE EVIDENZE DA STUDI DI MICROSPETTROSCOPIA FTIR

ASSESSMENT OF THE CHEMORESISTENCE TO CISPLATIN IN ORAL
CANCER STEM CELLS:
NEW INSIGHTS FROM FTIR MICROSPECTROSCOPY

Laureanda:

Sabrina Perfetto

Relatore:

Prof.ssa Elisabetta Giorgini

Correlatori:

Prof.ssa Simona Sabbatini

Dott. ssa Valentina Notarstefano

Anno accademico 2019/2020

Indice

Introduzione

Capitolo primo

1. Carcinoma squamocellulare del cavo orale

- | | |
|---------------------------------------|-----------|
| 1.1 Caratteristiche generali | 1 |
| 1.2 Cellule staminali tumorali (CSCs) | 2 |
| 1.3 Resistenza ai farmaci nelle CSCs | 11 |

Capitolo secondo

2. Molecole ad attività antitumorale: il cisplatino

- | | |
|------------------------------|-----------|
| 2.1 Caratteristiche chimiche | 16 |
| 2.2 Attività chemioterapica | 18 |

Capitolo terzo

3. Microspettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier

- | | |
|---|-----------|
| 3.1 Principi generali | 23 |
| 3.2 Bande di assorbimento dei principali componenti cellulari | 26 |

Capitolo quarto

4. Parte sperimentale

4.1 Preparazione delle cellule staminali tumorali CSC da colture cellulari tumorali primarie di OSCC-G3	31
4.2 Trattamento chemioterapico delle CSC	33
4.3 Test di vitalità cellulare	34
4.4 Analisi FTIRM e pre-processing spettrale	36
4.5 Analisi multivariata	39
4.6 Analisi univariata	40

Capitolo quinto

5. Risultati e discussione

5.1 Analisi Multivariata	42
5.2 Analisi Univariata	45

Capitolo sesto

6. Conclusioni	54
-----------------------	-----------

Bibliografia	56
---------------------	-----------

Introduzione

Il carcinoma squamocellulare (OSCC) è il tipo più comune di cancro della cavità orale; esso comporta danni alle cellule epiteliali di rivestimento a causa dell'accumulo di mutazioni genetiche multiple nelle cellule. Oltre alle cellule tumorali tipiche del carcinoma squamocellulare orale è possibile distinguere un altro tipo di cellule: le cellule staminali tumorali (CSC) (Döbrossy, 2005).

Le CSC rappresentano un gruppo di cellule circoscritte in una zona chiamata nicchia. Negli ultimi anni si è potuto constatare che le CSC giocano un ruolo importante nella formazione di recidive, in quanto sono in grado di generare nuove cellule tumorali, resistono ai farmaci antitumorali riformando il tumore in poco tempo e producono metastasi che invadono altri tessuti o organi (Prieto-Vila *et al.*, 2017).

Esistono diverse terapie mirate alla loro distruzione, tra cui il trattamento con Cisplatino, un agente chemioterapico con azione simile agli agenti alchilanti che agisce sul DNA, impedendo la replicazione e la trascrizione in RNA e inducendo le mutazioni al suo interno (Dasari *et al.*, 2014).

La Microspettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIRM) è una tecnica spettroscopica molto usata per lo studio di campioni biologici, quali cellule e tessuti. Tale tecnica è stata applicata nello studio di materiale neoplastico di pazienti affetti da diverse patologie tumorali consentendo di analizzarli tramite profili spettrali in tempi sensibilmente ridotti (Diem *et al.*, 2004).

La spettroscopia FTIRM permette di approfondire lo studio dei meccanismi di azione delle patologie tumorali identificando specifici marker spettrali riconducibili alle diverse patologie neoplastiche. Viene anche utilizzata per analizzare gli effetti citotossici di farmaci chemioterapici e di molecole di nuova generazione su linee cellulari tumorali e su cellule tumorali primarie (Shaw *et al.*, 2000).

Tramite una singola analisi di un solo campione è possibile ottenere un set completo di informazioni sulla composizione biochimica del campione stesso. Questa mole di dati, opportunamente processata tramite analisi chemiometrica, permette di associare le modificazioni spettrali dei campioni analizzati a precisi processi di natura biochimica (Diem *et al.*, 2004).

Nel presente lavoro di tesi, per la prima volta, la Microspettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIRM) è stata utilizzata per studiare una popolazione di cellule staminali tumorali (CSC) ottenute da cellule primarie del

carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC) trattate con Cisplatino per 16, 24 e 48 ore. Gli obiettivi del presente studio sono: (1) caratterizzare dal punto di vista spettroscopico le CSC; (2) individuare i meccanismi di azione del cisplatino su tale popolazione cellulare, e (3) evidenziare possibili fenomeni di chemioresistenza a tale farmaco.

CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL CAVO ORALE

1.1 Caratteristiche generali

I tumori maligni che colpiscono il cavo orale sono abbastanza frequenti e rappresentano circa il 10% di tutte le neoplasie del corpo umano. Nella maggior parte dei casi, si tratta di carcinomi, cioè tumori che originano dall'epitelio di rivestimento, tra i quali il più diffuso ed aggressivo è il carcinoma squamocellulare (Oral Squamous Cells Carcinoma, OSCC), che rappresenta il 90% dei tumori del cavo orale. L'OSCC è, infatti, la più comune neoplasia del distretto testa/collo, classificato come l'ottantesimo tumore più frequente nel mondo e responsabile del 3% dei decessi negli uomini e dell'1% dei decessi nelle donne (Döbrossy *et al.*, 2005).

Le sedi d'insorgenza del tumore del cavo orale sono strettamente correlate all'esposizione a diversi fattori di rischio. Le regioni anatomiche più colpite sono, infatti, rappresentate dai pilastri faringei, dal pavimento orale e dalla lingua, che

costituiscono le principali vie di deflusso e di ristagno del cibo, fumo e altri agenti cancerogeni (Green *et al.*, 2002).

Il trattamento del carcinoma del cavo orale si presenta particolarmente complesso in relazione alla sede, all'età del paziente e all'estensione, in quanto è spesso associato ad un'alta incidenza di recidive, che rappresentano la maggior parte dei fallimenti post-chirurgici e radioterapici. Il comportamento aggressivo ed invasivo di tale neoplasia, insieme alla frequente manifestazione di metastasi, fanno sì che l'OSCC recidivante sia spesso legato ad una prognosi infausta che rappresenta quindi una sfida clinica importante (Da Silvia *et al.*, 2012; Baillie *et al.*, 2017).

I principali fattori di rischio sono l'esposizione ad agenti cancerogeni esogeni, come il fumo di tabacco e l'eccessivo consumo di alcolici. La combinazione di entrambi i fattori sembra aumentare l'effetto cancerogeno, ma quasi il 15-20% dei casi si verifica in pazienti senza questi tradizionali fattori di rischio (Vargas Ferreira *et al.*, 2017).

1.2 Cellule staminali tumorali (CSCs)

Per oltre 30 anni le cellule staminali sono state usate per la ricostruzione del sistema sanguigno e del sistema immunitario danneggiato dalle cellule tumorali o

durante il trattamento con chemio- e radioterapici (Sagar *et al.*, 2007). Il termine staminale deriva dal greco (stamìs) o dal latino (stamen). In entrambi i casi il termine si riferisce ad un elemento strutturale fondamentale. In lingua inglese la parola “staminale”, tradotta con il termine “*stem*”, significa invece ceppo, radice. Nel 1981 due genetisti dell’Università di Cardiff in Inghilterra, *Martin Evans e Matthew Kaufman*, riuscirono per la prima volta ad isolare queste cellule da embrioni di topo e a farle crescere in laboratorio: le cosiddette cellule staminali embrionali. Nel 1998, presso l’Università del Wisconsin, *James Thomson* isolò per la prima volta delle cellule staminali embrionali umane, riuscendo a generare delle linee cellulari stabili nel tempo.

Le cellule staminali sono cellule non specializzate presenti in tutti gli organismi viventi e sono caratterizzate da tre proprietà (Johnson *et al.*, 2015):

- sono indifferenziate, ovvero non hanno un’identità funzionale definita;
- sono capaci di auto-rinnovarsi, ovvero replicandosi originano altre cellule staminali;
- sono in grado di originare tutte le cellule che costituiscono un individuo adulto, contribuendo alla riparazione dei tessuti.

La combinazione di queste tre proprietà rende le cellule staminali estremamente versatili ed importanti dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

I tessuti, quindi, si auto-rinnovano proprio attraverso l'attività di una popolazione specializzata di cellule staminali tissutali, chiamate cellule staminali adulte. Diversamente dalla massa di cellule che popolano i tessuti, le cellule staminali adulte sono longeve e generano per tutta la vita una progenie di cellule specializzate di breve durata che eseguono le funzioni di tessuti specifici.

Le cellule staminali costituiscono sia l'origine della complessa varietà che caratterizza ogni organismo a partire dallo sviluppo embrionale, sia una fonte per la rigenerazione dei tessuti negli individui adulti. La capacità di auto-rinnovamento implica il fatto che, almeno una delle due cellule che si originano in seguito alla divisione cellulare, debba restare staminale. Quando una cellula staminale si divide, ogni cellula figlia ha due possibilità: rimanere staminale oppure diventare una cellula con una funzione specializzata. Le cellule staminali possono effettuare due tipi di divisioni cellulari: divisione simmetrica e asimmetrica.

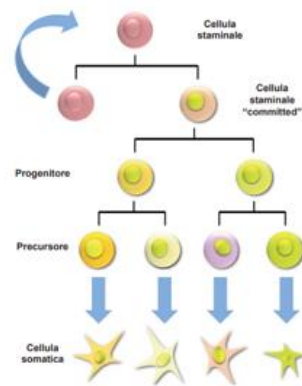


Figura 1.1 Divisione cellulare asimmetrica: una delle due cellule che si originano in seguito alla divisione cellulare di una cellula staminale si differenzia in uno dei possibili tipi di cellula somatica di cui è formato l'organismo. Gli stadi attraverso cui passa prima di raggiungere la completa specializzazione sono quello di cellula progenitore e di cellula precursore (http://www.adoces.it/wordpress/wp-content/uploads/2012/05/Dispensa_Le-cellule-staminali-spunti-per-unazione-didattica.pdf).

Nel primo caso, da una cellula staminale se ne originano due; nel secondo caso, una delle due cellule resta staminale mentre l'altra inizia un processo di differenziazione, passando ad uno stadio adulto (cellula somatica). La seconda caratteristica fondamentale che contraddistingue le cellule staminali è la loro capacità di specializzarsi, di diventare cioè cellule di tessuti o di organi specifici con funzioni particolari.

La diffusione di una neoplasia dipende, in parte, da un piccolo numero di cellule staminali circoscritte in una zona ristretta del tumore (nicchia) chiamate cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells, CSC*) (Jordan *et al.*, 2004). Le nicchie sono costituite da numerosi tipi di cellule stromali, tra cui cellule endoteliali e mesenchimali, macrofagi e fibroblasti, ma includono anche le sostanze secrete da queste cellule, come i fattori di crescita, o citochine, e la matrice extracellulare.

Le CSC costituiscono solitamente una minoranza all'interno di un tumore e presentano tre principali caratteristiche:

- sono indispensabili per la crescita del tumore, perché generano tutte le altre cellule tumorali;
- sono resistenti ad alcune terapie farmacologiche antitumorali: spesso sopravvivono alla chemioterapia e riformano il tumore dopo mesi o anni;
- sono responsabili della formazione di metastasi, cioè della disseminazione del tumore in altre parti del corpo (Kuşoğlu *et al.*, 2019).

L'auto-rinnovamento e la proliferazione sono attività incontrollate che producono popolazioni progenitrici con fenotipi alterati. La loro capacità proliferativa permette alle cellule di duplicarsi e di differenziarsi in grandi popolazioni eterologhe di cellule tumorali che possono risultare resistenti ai trattamenti chemioterapici e radioattivi (Rich *et al.*, 2006).

Le CSC sono state descritte per la prima volta nel 1971 da Perce e Wallance e successivamente identificate nel 1997 dai ricercatori Bonnet e Dick, durante uno studio sulla leucemia mieloide acuta (AML) dove si è potuto dimostrare la loro similarità con le cellule staminali indifferenziate. La Figura 1.2 mostra come, a prima vista, le CSC siano molto simili a qualsiasi altro tipo di cellula, in quanto hanno una forma tondeggiante, mentre le cellule tumorali differenziate presentano forme diverse a seconda del tessuto in cui si sviluppano (Batlle *et al.*, 2017).

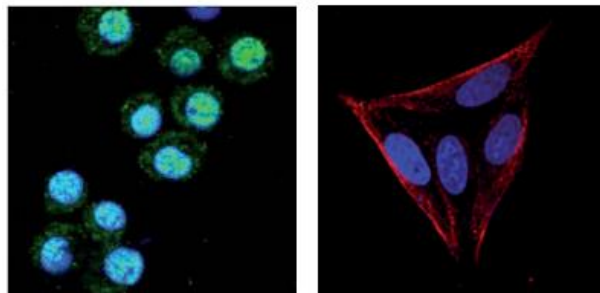


Figura 1.2 Confronto tra cellule staminali tumorali e cellule tumorali specializzate (http://www.adoces.it/wordpress/wp-content/uploads/2012/05/Dispensa_Le-cellule-staminali-spunti-per-unazione-didattica.pdf).

Le CSC hanno la tendenza a formare delle sfere composte da cellule staminali e dalle loro cellule figlie, nel momento in cui vengono messe in coltura (Fig.1.3).

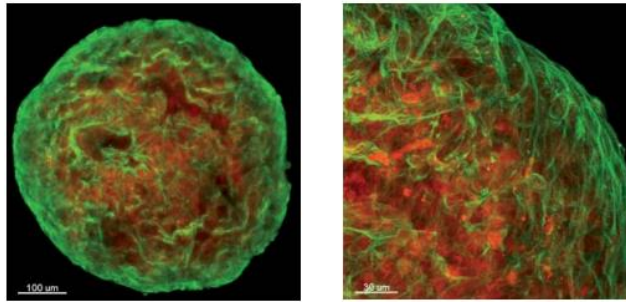


Figura 1.3 Sfera formata da cellule tumorali dell'intestino e ingrandimento della stessa. I nuclei delle cellule sono colorati in rosso ed i citoplasmi in verde (http://www.adoces.it/wordpress/wp-content/uploads/2012/05/Dispensa_Le-cellule-staminali-spunti-per-unazione-didattica.pdf).

Si può ricorrere, ad esempio, alla colorazione immunohistochimica che evidenzia la presenza di alcune proteine esposte sulla membrana della cellula (marcatori di membrana OCT4, SOX2, NANO G), che però sono generalmente presenti anche sulle cellule staminali normali, rendendo molto difficile distinguere i due tipi cellulari (Fu *et al.*, 2016).

Le staminali tumorali vengono anche riconosciute per la loro capacità di espellere velocemente alcune sostanze chimiche o per la presenza di particolari enzimi. Ad oggi, l'origine delle CSC non è ancora ben definita; alcuni studi ipotizzano che possano derivare dalle cellule staminali del tessuto in cui il tumore si è sviluppato, in seguito ad un processo di mutazione, oppure derivare da una categoria di cellule staminali “progenitrici” che hanno acquisito capacità di auto-rinnovo, generando

tumori con fenotipi e profili di espressione genica comparabili (Jordan *et al.*, 2006) (Fig.1.4).

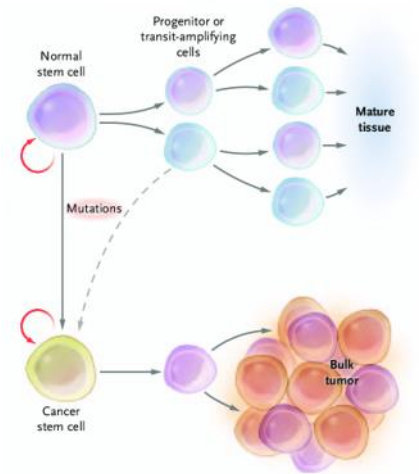


Figura 1.4: Modello semplificato sull'origine delle cellule staminali tumorali (Jordan *et al.*, 2006).

Il processo che porta alla formazione delle CSC consiste di due meccanismi principali: gli eventi epigenetici e le mutazioni. Gli eventi epigenetici come la metilazione del DNA, il rimodellamento della cromatina, gli RNA non codificanti e le modifiche degli istoni sono in parte responsabili del destino delle cellule, che possono trasformarsi in cellule tumorali. Alcuni studi mostrano che la causa principale della formazione delle CSC è rappresentata da eventi di ipo- o iper-metilazione, in base al tipo di tessuto colpito (Afify *et al.*, 2019).

In particolare, la formazione delle CSC mediata da ipo-metilazione è associata all'attivazione degli oncogeni, mentre quella mediata da iper-metilazione è associata al silenziamento dei geni soppressori tumorali. Entrambi i meccanismi inducono instabilità genomica e svolgono un ruolo dominante nell'insorgenza e nella progressione del tumore (Afify *et al.*, 2019).

Le mutazioni, invece, sono responsabili della progressione del tumore e hanno un ruolo secondario nella formazione delle CSC. È stato dimostrato, però, che la presenza di una sola mutazione non riesca a garantire la trasformazione di una cellula non tumorale in una tumorale. La maggior parte delle mutazioni oncogenetiche nelle cellule staminali è responsabile della modificazione di processi cellulari che regolano la divisione cellulare, la riparazione dei danni al DNA e le vie di trascrizione dei segnali (Afify *et al.*, 2019).

La scoperta delle CSC nei tumori mammari e cerebrali ha dato il via all'identificazione di cellule staminali in molti altri tumori solidi: a partire dal 2007, la loro presenza è stata individuata nei tumori dell'intestino, del pancreas, della prostata, del polmone, della tiroide, dello stomaco, del rene, dell'ovaio e della vescica (Dasari *et al.*, 2014).

Le cellule staminali tumorali sono state identificate anche nel carcinoma squamocellulare della cavità orale (OSCC), costituito da una popolazione eterogenea di cellule. La neoplasia origina da un piccolo numero di cellule

staminali tumorali all'interno dello stroma peritumorale, che si differenziano e danno origine alle cellule cancerose. Purtroppo, poiché la lesione tumorale è raramente sintomatica in fase iniziale, risulta importante studiare i profili di espressione di un certo numero di marcatori proteici, anche se, per il momento, non è stato individuato nessun marcatore in grado di identificare da solo e in modo inequivocabile le CSC (Jordan *et al.*, 2006).

Considerando l'elevata somiglianza strutturale tra le cellule staminali tumorali (CSC) e le cellule staminali (SC), una delle sfide più importanti è mettere a punto una cura farmacologica che riesca a colpire selettivamente le CSC, senza interferire sull'attività cellulare delle SC. Una volta individuati dei processi o delle caratteristiche su cui le staminali tumorali basano la loro sopravvivenza, si potranno sviluppare delle nuove terapie mirate, che colpiscano efficacemente le cellule staminali tumorali senza danneggiare eccessivamente le cellule normali.

1.3 Resistenza ai farmaci nelle CSC

Le CSC possono essere considerate dei potenziali iniziatori del tumore. La riduzione delle dimensioni di quest'ultimo dipende dalla risposta al trattamento: durante il trattamento chemioterapico, la maggior parte delle cellule tumorali primarie possono essere distrutte, ma se non vengono eliminate le CSC, queste

possono migrare in siti distali, creare lesioni metastatiche e rigenerare il tumore (Fig. 1.5).

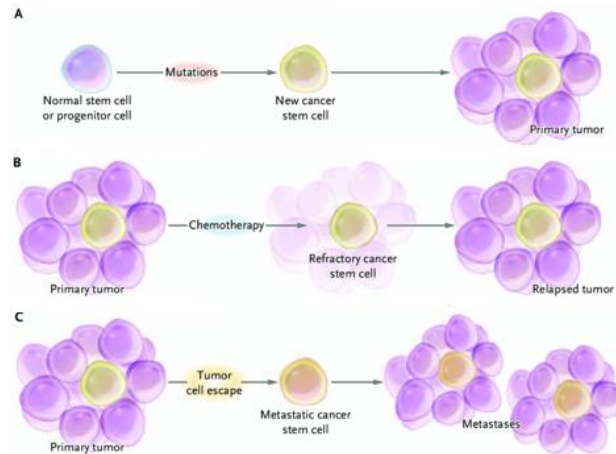


Figura 1.5 Rappresentazioni delle cellule staminali tumorali: (a) cellule staminali normali o cellule progenitrici (viola) che possono mutare in cellule staminali tumorali (giallo) generando un tumore primario; (b) cellule tumorali primarie (viola) degradate con la chemioterapia, ad eccezione della cellula staminale (giallo) che può essere causa di recidive; (c) cellule staminali tumorali (giallo) derivanti da un tumore primario (viola) che raggiungono siti distali generando lesioni metastatiche (Jordan *et al.*, 2006).

Esistono due categorie di resistenza: *resistenza acquisita*, che si sviluppa come risposta al trattamento, e *resistenza intrinseca*, in cui è presente la resistenza ad una tipologia di farmaci, anche se i farmaci in questione non sono mai stati utilizzati contro uno specifico tumore (Schmidt *et al.*, 2016). I trattamenti chemioterapico e radioterapico eliminano la maggior parte della popolazione di cellule staminali normali, SC, ma non colpiscono le CSC. La ragione principale

della resistenza ai farmaci sembra risiedere proprio nelle somiglianze morfologiche tra CSC e SC ma, mentre le SC hanno sviluppato diversi meccanismi per evitare la morte per apoptosi o senescenza cellulare, le CSC utilizzano questi stessi meccanismi contro le terapie del cancro.

In particolare, i meccanismi di resistenza ai trattamenti sono:

- 1) **transizione epiteliale-mesenchimale (EMT)**: attiva i percorsi di segnalazione delle SC inducendo le CSC ad aumentare la resistenza ai farmaci. Nella maggior parte dei casi, i meccanismi molecolari responsabili dell'EMT e la conseguente resistenza rimangono incerti;
- 2) **stato di quiescenza**: le cellule sottoposte a EMT possono entrare in uno stato di quiescenza, nel quale viene inibito anche il processo di divisione cellulare;
- 3) **trasportatori di transmembrana**: svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo del multidrug resistance (MDR) grazie alla loro capacità di eliminare le sostanze tossiche dalla cellula (compresi farmaci).
- 4) **ipossia**: una minor concentrazione di ossigeno contribuisce al mantenimento delle caratteristiche delle CSC che sono in genere localizzate nelle zone ipossiche vicine ai tumori.
- 5) **elevata capacità di sopravvivenza**: con l'attivazione di un sistema di risposta al danno che promuove l'espressione di proteine di riparazione, le CSC resistono ai farmaci e ai danni che essi possono provocare al DNA.

Oltre ai sistemi di riparazione del DNA, le CSC evitano l'apoptosi attraverso la mutazione o l'inattivazione dei geni che regolano il ciclo cellulare e dei geni che inducono l'apoptosi.

Per poter eliminare la possibilità di recidiva del tumore, quindi, la terapia dovrebbe concentrarsi sulla completa eradicazione della popolazione di CSC, per le quali, ad oggi, non è stato individuato nessun marcatore universale (Prieto-Vila *et al.*, 2017).

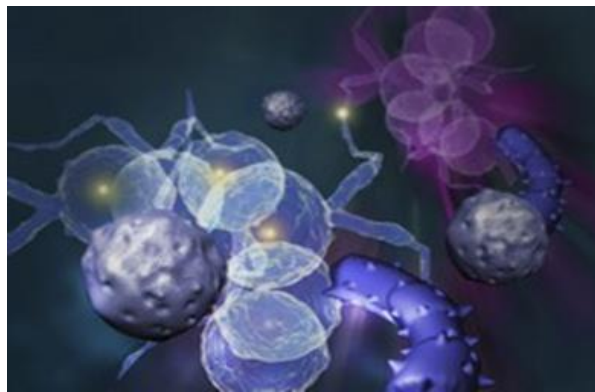


Figura 1.6 Nicchia tumorale (<https://thumbs.dreamstime.com/b/cellula-tumorale-37420671.jpg&imgrefurl>).

Le neoplasie, nelle quali le CSC giocano un ruolo essenziale, possono evolvere in tre modi:

1. il tumore primario può sviluppare in seguito alla mutazione delle normali cellule staminali, o cellule “progenitrici” nelle CSC, che risultano, quindi,

indispensabili per la progressione del tumore perché generano tutte le altre cellule tumorali;

2. la maggior parte delle cellule del tumore primario possono essere debellate durante la chemioterapia; se, però, le CSC non vengono degradate del tutto, il rischio di recidive potrebbe essere molto alto;
3. le CSC possono migrare in siti distali dal tumore primario e formare le metastasi.

È evidente, perciò, l'importanza di mettere a punto delle terapie che abbiano come bersaglio proprio le CSC perché la loro morte potrebbe contribuire ad eliminare definitivamente il tumore. Purtroppo, però, come è già stato detto, non è sempre facile riconoscerle e la problematica è ancora in continua evoluzione (Abdullah *et al.*, 2013).

MOLECOLE AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE: IL CISPLATINO

2.1 Caratteristiche chimiche

Cisplatino o cis-diamminedichloroplatinum (II), è un noto farmaco ad attività chemioterapica. È un composto metallico (platino) con una geometria planare quadrata e si presenta come una polvere cristallina di colore bianco, giallo intenso o giallo-arancio a temperatura ambiente. È poco solubile in acqua e solubile in dimetilprimanide e N,N-dimetilformammide (o DMF).

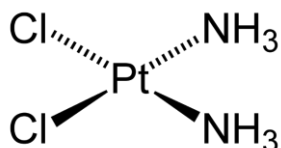


Figura 2.1 Struttura chimica del Cisplatino (<https://it.wikipedia.org/wiki/Cisplatino>)

Il cisplatino ha un peso molecolare di 301,1g/mol, una densità di 3,74 g/cm³ e una solubilità in acqua di 2,53 g/L a 25 °C. Il cisplatino si attiva quando entra nella cellula: se idrolizzato diventa un potente elettrofilo che può reagire con qualsiasi nucleofilo, compresi i gruppi solfidrilici sulle proteine e gli atomi di

azoto sugli acidi nucleici. Il cisplatino si lega al centro reattivo N7 sui residui di purine e come tale può causare danni all'acido desossiribonucleico (DNA) nelle cellule tumorali, bloccando la divisione cellulare e determinando la morte cellulare per apoptosi (Dasari *et al.*, 2014).

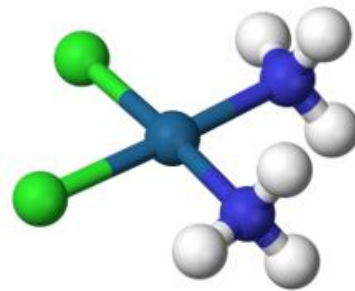


Figura 2.2 Molecola tridimensionale “ball-and-stick” di Cisplatino. L’atomo centrale è il platino (Pt). Le due estremità verdi rappresentano il cloro mentre le altre due sono molecole di ammoniaca (<https://it.wikipedia.org/wiki/Cisplatino>).

Il cisplatino fu sintetizzato per la prima volta da M. Peyrone nel 1844 e la sua struttura chimica fu confermata da Alfred Werner nel 1893. Tuttavia, sul composto non vennero fatte ricerche scientifiche fino al 1960, quando gli studi di Rosenberg e Van Camp presso la Michigan State University rilevarono che l’utilizzo di un reattore dotato di due elettrodi semicilindrici costituiti da una rete di platino immersi in un brodo di coltura, mantenuto alla temperatura di 37°C e contenente importanti quantità di ioni cloruro e di glucosio, era in grado di inibire la divisione cellulare in *Escherichia coli*, suscitando molto interesse per il

possibile uso di questi prodotti nella chemioterapia antitumorale. Negli anni '60, si scoprì che aveva proprietà citotossiche e alla fine degli anni '70 divenne la chiave nel trattamento sistemico dei tumori delle cellule germinali (Rosenberg *et al.*, 1965). Il cisplatino ha dimostrato di avere attività antitumorale in vari tipi di neoplasie ed è sicuramente uno dei farmaci più utilizzati per il loro trattamento. È stato il primo composto a base di platino approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento del cancro nel 1978. Oltre al cisplatino anche il palladio e altri metalli nobili sono poi stati usati nel trattamento del cancro (Dasari *et al.*, 2014).

2.2 Attività chemioterapica

Il cisplatino è un agente chemioterapico che ha un'azione simile agli agenti alchilanti. Modificando il DNA può impedirne la replicazione e la trascrizione in RNA e può indurre mutazioni al suo interno.

La modalità di azione è stata collegata alla sua capacità di creare legami crociati intracatena legandosi alle basi puriniche del DNA, interferendo con i suoi meccanismi di riparazione e inducendo successivamente l'apoptosi nelle cellule tumorali (Fig. 2.3).

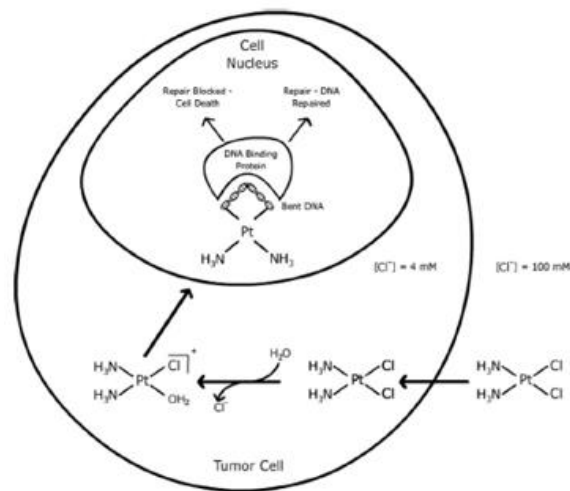


Figura 2.3 Meccanismo d'azione del Cisplatino. Il cisplatino entra nella cellula legandosi al DNA. Se il DNA non viene riparato, la cellula va incontro ad apoptosi (Alderden *et al.*, 2006).

La resistenza ai farmaci è stata osservata in molti pazienti che hanno avuto una ricaduta dopo il trattamento con cisplatino. I processi cellulari proposti per motivare la resistenza al cisplatino sono, principalmente, il cambiamento nell'assorbimento cellulare, l'aumento dei meccanismi di riparazione del DNA e il processo di *anti*-apoptosi.

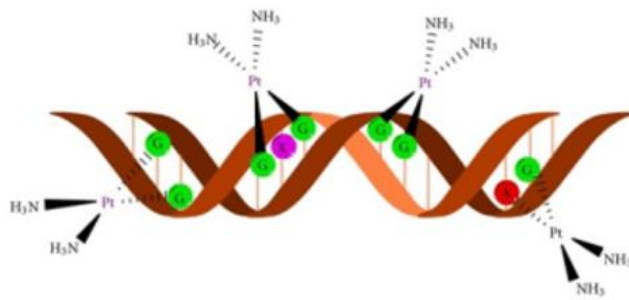


Figura 2.4 Il Cisplatino può formare differenti legami intrastrand con le purine del DNA (<https://www.ilsuperuovo.it/biochimica-del-cisplatino>)

Il cisplatino è usato nel trattamento del carcinoma ovarico, dei testicoli, del tratto biliare, del polmone, del tratto gastrico, della ghiandola salivare, della mammella, del colon, della prostata, del melanoma e della cavità orale (e viene somministrato per via endovenosa lenta o per infusione (Dasari *et al.*, 2014). Considerando, inoltre, i numerosi effetti collaterali derivanti dalla somministrazione del farmaco (nefrotossicità, reazioni anafilattiche, diminuzione dell'immunità alle infezioni, disturbi gastrointestinali, alopecia e tinnito) specialmente nei pazienti più giovani, il cisplatino è stato combinato ad altri farmaci antitumorali, suoi analoghi, come il carboplatino, oxaliplatino e altri (Dasari *et al.*, 2014).

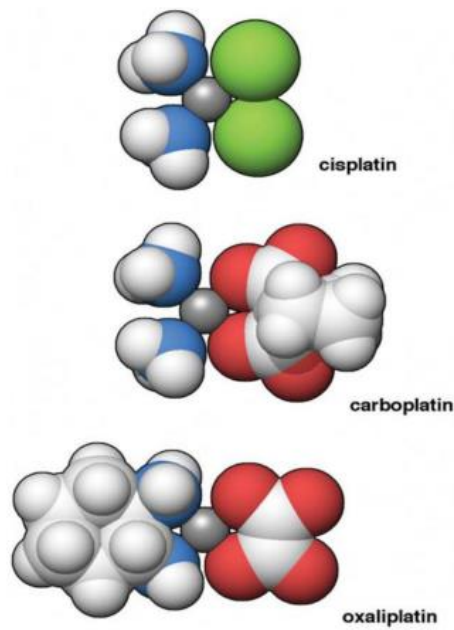


Figura 2.5 Strutture molecolari del cisplatino, carboplatino e oxaliplatino (Goodsell *et al.*, 2006).

L'utilizzo del carboplatino riduce gli effetti collaterali provocando minore nefrotossicità, neurotossicità, ototossicità, nausea e vomito essendo maggiormente mielotossico. L'oxaliplatino provoca una tossicità prevalentemente di tipo neurologico (Goodsell *et al.*, 2006).

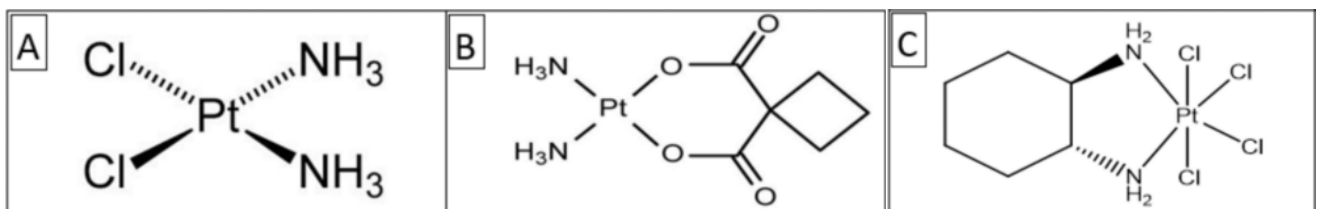


Figura 2.6 Struttura chimica: A-cisplatino; B-carboplatino; C-oxaliplatino (Weiss *et al.*, 1993).

Una delle cause principali della resistenza al trattamento con il cisplatino, che porta alla ricomparsa del tumore con conseguenti metastasi, è la presenza delle CSC.

MICROSPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATA DI FOURIER

3.1 Principi generali

La spettroscopia infrarossa accoppiata alla microscopia ottica, definita come Microspettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIRM) permette di analizzare in maniera puntuale campioni biologici non omogenei con risoluzione spaziale fino al limite della diffrazione (*ca.* 5 micron).

Una delle prime applicazioni della spettroscopia FTIRM è stata l'identificazione e la differenziazione batterica. Ogni specie batterica è infatti caratterizzata da un'unica e specifica distribuzione di molecole biochimiche e quindi da uno spettro IR caratteristico. Utilizzando la *cluster analysis* su una quantità rilevante di spettri acquisiti da svariate colture batteriche, è stato possibile ottenere due *clusters* principali, che evidenziavano i GRAM + e i GRAM -. Da questi interessanti risultati si è preso lo spunto per ottenere gruppi di spettri che potessero identificare cellule umane derivanti da tessuti normali e patologici (quali tumori benigni o

maligni) e creare quindi una procedura di screening e di analisi utilizzabile come metodo diagnostico e prognostico (Naumman *et al.*, 1988).

Verso la fine degli anni '90 si arrivò alla conclusione che sia i tessuti sia i campioni di fluidi biologici (sangue, plasma), codificabili con l'IR, fornissero molte informazioni sullo stato del paziente (Jackson *et al.*, 1997).

Un singolo spettro di plasma, di sangue o di siero permette di identificare la presenza e la concentrazione di tutti gli analiti attivi alla radiazione infrarossa, evidenziando l'eventuale presenza di una patologia. Ciò è valido anche per l'analisi spettroscopica di un tessuto, nel quale le variazioni a livello biochimico possono derivare da cambiamenti fisiologici dello stesso, o dalla degenerazione dei suoi componenti per l'insorgere di una malattia (Shaw *et al.*, 2006).

Nel tempo si è arrivati effettivamente a dei risultati molto incoraggianti per numerose tipologie di tumore su un numero elevato di organi studiati, quali cervello (Kneipp *et al.*, 2000), cervice (Walsh *et al.*, 2007), colon (Conti *et al.*, 2009), cuore (Wang *et al.*, 2005), prostata (Gazi *et al.*, 2006), epidermide (Crupi *et al.*, 2000), seno (Anastassopoulou *et al.*, 2009), fegato (Wang *et al.*, 2003) e polmone (Sulè-Suso *et al.*, 2005).

I risultati, sia qualitativi che quantitativi, ottenuti lavorando, ad esempio, su tumori della pelle e della cervice presentano un grado di accuratezza elevato: il

95% delle attribuzioni relative al grado di avanzamento della malattia sono state avvalorate da test istochimici. La presenza di metastasi nei linfonodi è stata correttamente predetta nel 75% dei casi posti in analisi.

Una review particolarmente accurata riporta una serie di lavori sulla determinazione della maturazione cellulare nel tessuto cervicale, utilizzando due distinti approcci: il primo consiste nel confrontare i dati raccolti con l'IR con quelli derivanti dall'analisi istologica; il secondo nel giungere ad un risultato senza conoscere a priori la diagnosi (blind test). Ciò ha permesso di dimostrare che l'analisi vibrazionale è in grado di individuare differenze nella composizione biochimica cellulare (Walsh *et al.*, 2007).

Sono stati condotti studi anche sulla possibilità di collegare lo spettro allo stadio di divisione cellulare, ovvero definire in quale fase della vita (G1, S, G2, M) si trovi la cellula nel momento in cui viene analizzata. Effettivamente ogni fase cellulare è ben distinta e i rispettivi spettri sono differenti gli uni dagli altri (Bedolla *et al.*, 2014).

Uno dei principali vantaggi della spettroscopia FTIRM è quello di analizzare zone specifiche del campione tramite una scansione puntuale della superficie, associando ad ogni punto uno spettro IR; in tal modo è possibile creare mappe con alto grado di definizione ed elevato numero di informazioni spettrali. Il futuro di tale tecnica prevede l'utilizzo di sorgenti non convenzionali, quali la luce di

sincrotrone. Questa particolare radiazione, utilizzata per la prima volta nel 1998 per l'acquisizione di spettri da materiale biologico (Jamin *et al.*, 1998), ha permesso di migliorare la qualità spettrale con un tempo di acquisizione ridotto rispetto ad uno strumento convenzionale (Diem *et al.*, 2004).

Con la luce di sincrotrone è possibile utilizzare un'apertura del microscopio estremamente piccola (3-6 μm), necessaria, ad esempio, per l'acquisizione delle componenti cellulari, con un rapporto segnale/rumore alto e senza le interferenze dovute alla diffrazione.

3.2 Bande di assorbimento dei principali componenti cellulari

La spettroscopia infrarossa si presta all'analisi di tessuti e cellule. Infatti, i vari componenti cellulari presentano delle bande di assorbimento caratteristiche (Fig. 3.1).

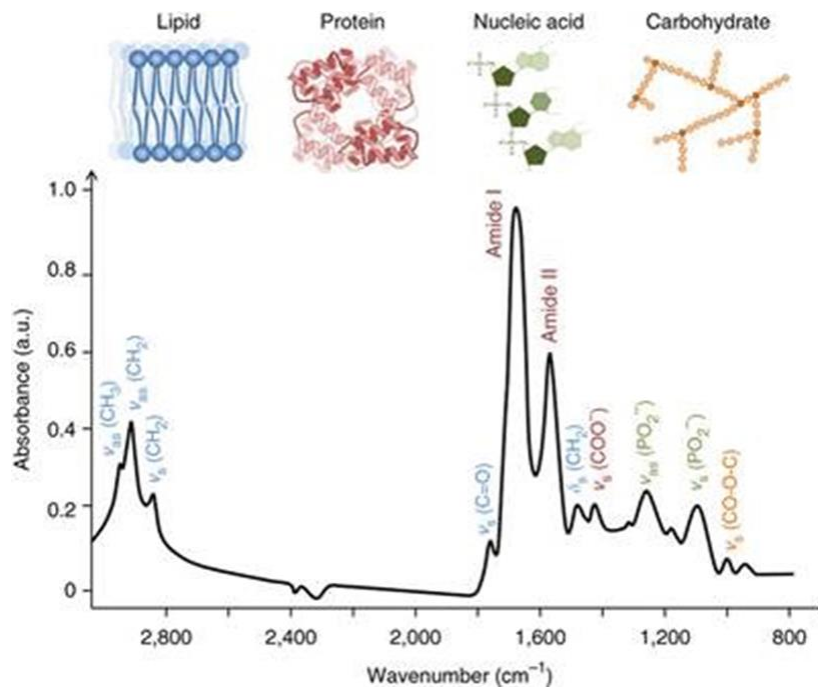


Figura 3.1. Spettro IR di un campione biologico e significato biologico delle principali bande.

Proteine. La spettroscopia FTIRM permette di analizzare il pattern proteico di un campione, in termini di struttura secondaria. Le bande associate al gruppo Ammidico sono le seguenti:

- Ammide I (~1660 cm⁻¹) dovuta a 80% stretching C=O, 10% stretching C-N e 10% bending N-H; la posizione di questa banda dipende dai legami idrogeno presenti tra i gruppi C=O ed N-H e quindi dalla struttura secondaria della proteina. È una banda convoluta formata da diverse sottobande che possono essere identificate tramite la procedura di Peak

Fitting; ogni sottobanda può essere associata alle varie conformazioni, quali α -elica, β -sheet, β -turn e random (Fig. 3.2).

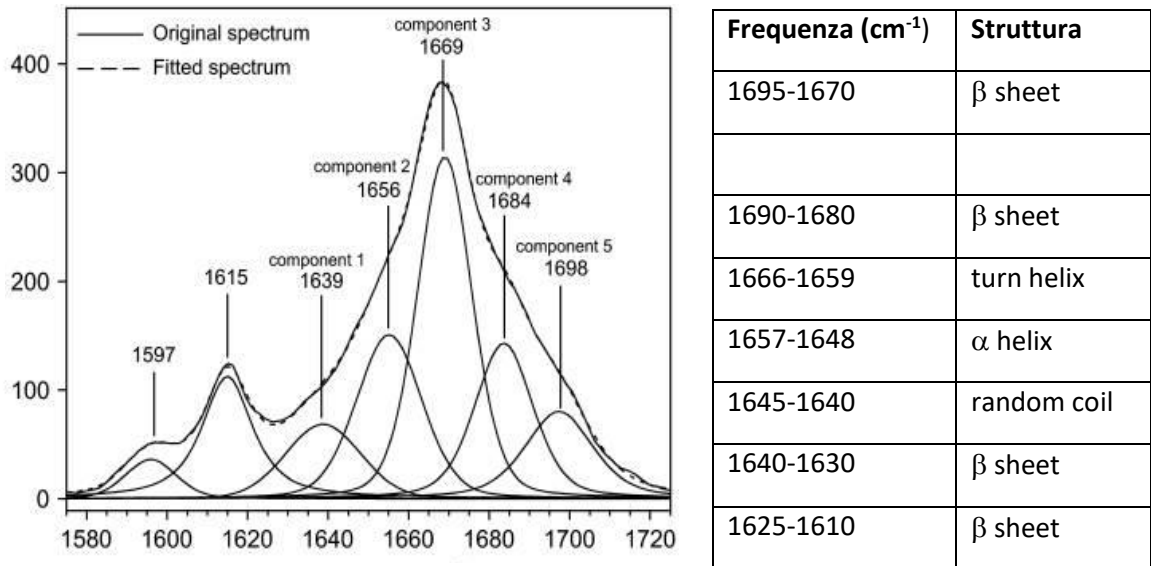


Figura 3.2. Peak fitting della banda Ammide I e principali sottobande componenti.

- Ammide II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$), anch'essa convoluta, dovuta a 60% bending N-H e 40% stretching C-N; anche in questa zona è possibile valutare l'andamento della struttura secondaria, anche se è meno sensibile ai cambiamenti conformazionali.
- Ammide III (formata da diverse bande fra cui ~ 1400 , ~ 1310 , ~ 1290 e $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$) è associata a vibrazioni più deboli, che comprendono le

vibrazioni dei gruppi COO⁻, la deformazione dei legami C-H e N-H, e le vibrazioni delle catene laterali delle proteine.

Acidi nucleici. Lo spettro IR degli acidi nucleici varia in funzione dello stato di idratazione e della struttura secondaria delle molecole di DNA o RNA considerate. Come per le proteine, è possibile individuare nello spettro degli acidi nucleici, dei picchi caratteristici, che possono essere raggruppati in:

- componenti vibrazionali della base azotata (1800-1500 cm⁻¹), che comprende gli assorbimenti a 1610 e 1578 cm⁻¹, corrispondenti rispettivamente allo stretching dei gruppi C=C e C=N dell'anello imidazolico;
- componenti vibrazionali dovute alla combinazione fra la base e lo zucchero (1500-1250 cm⁻¹), poco visibili;
- componenti vibrazionali dovute alla combinazione fra lo zucchero ed i gruppi fosfato (1250-900 cm⁻¹); i picchi relativi allo stretching asimmetrico e simmetrico del PO₂⁻ si trovano a 1230 e 1089 cm⁻¹, per il DNA, e a 1244 e 1084 cm⁻¹ per l'RNA. In più per l'RNA è presente la banda a 996 cm⁻¹ relativa alle vibrazioni dell'uracile.

Lipidi. I fosfolipidi, componenti principali del doppio strato della membrana cellulare, mostrano un assorbimento a 1730 cm⁻¹, dovuto allo stretching del C=O

del legame estereo tra la coda e la testa, e quattro bande nella regione compresa tra 2800 e 3000 cm^{-1} , generate rispettivamente dagli stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi metilenici (CH_2) e metilici (CH_3) delle catene degli acidi grassi (Stuart, 1997).

PARTE SPERIMENTALE

4.1 Preparazione delle cellule tumorali staminali CSC da colture cellulari tumorali primarie di OSCC-G3

L'ottenimento delle colture cellulari primarie di OSCC di grado 3 (OSCC-G3), come pure il loro arricchimento con le cellule staminali e il successivo trattamento delle CSC con cisplatino è stato effettuato presso il Laboratorio di Anatomia Patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Politecnica delle Marche, dal Prof. Corrado Rubini e dalla Dott.ssa Romina Rocchetti. Di seguito vengono riportate le procedure seguite.

Le cellule primarie di OSCC-G3 utilizzate per lo studio sono state ottenute da 5 pazienti (3 uomini e 2 donne), con un'età compresa tra i 45 ed i 60 anni, affetti da un carcinoma squamocellulare OSCC di grado 3. Il tessuto tumorale della biopsia prelevato tramite resezione chirurgica, in condizioni di sterilità, è stato immerso nel terreno di coltura DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), addizionato con gentamicina 50µg/ml, ed è stata effettuata la dissociazione in singoli frammenti di circa 1 mm³. I frammenti sono stati trasferiti in una fiasca

(T-25) con l'aggiunta del DMEM F-12 e FBS (siero bovino fetale) al 10%, successivamente la T-25 è stata mantenuta in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO₂. La biopsia è stata periodicamente monitorata al microscopio e sono stati effettuati gli opportuni cambi di terreno; dopo due settimane attorno a ciascun frammento sono comparsi i primi fibroblasti fino ad occupare l'intera superficie della fiasca. Dopo circa un mese accanto ai fibroblasti è comparsa un'altra popolazione cellulare di origine epiteliale, come confermato dall'analisi immunocitochimica condotta con l'anticorpo citocheratina che è specifico per l'identificazione di cellule epiteliali.

La coltura primaria utilizzata per tutti gli esperimenti è stata fatta aderire in una fiasca (T-25), in DMEM F-12 e FBS (siero bovino fetale) al 10%, addizionati di 50 µg/ml di gentamicina, e mantenuta in coltura a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Raggiunto il 90% della confluenza, le cellule primarie OSCC-G3 sono state raccolte e arricchite in termini di cellule staminali tumorali (CSC). Tale arricchimento è stato ottenuto mediante crescita cellulare nel terreno di coltura deprivato di siero e addizionato di specifici fattori di crescita: basic fibroblast growth factor (Bfgf) ed epidermal growth factor (EGF). In particolare, le cellule primarie OSCC-G3 sono state seminate in piastre da 6-well, con una densità di 200.000 cellule in 3 ml di terreno contenente cellule staminali contenenti

DMEM/F12. 1% di N₂, 10 ng/ml di bFGF ricombinante umano, 10 ng/ml di EGF ricombinante umano e 1% di antibiotico-antimicotico. Questo trattamento è stato ripetuto ogni 2 giorni per 2 settimane. Le squamosfere di CSC sono state confrontate con le cellule aderenti di colture primarie di OSCC. Le cellule staminali tumorali di OSCC ottenute sono state quindi utilizzate per il trattamento con il cisplatino.

4.2 Trattamento chemioterapico delle CSC

Una porzione di CSC derivate da OSCC-G3 è stata divisa in 6 aliquote (*ca.* 200.000 cellule), ognuna delle quali è stata seminata in piastre da 6-well, trattata con 3 ml di DMEM/F-12 e FBS al 10% e incubata al 5% CO₂ a 37°C. Dopo 24 h, tre aliquote sono state trattate con cisplatino (7 µg/mL) rispettivamente per 16, 24 e 48 h; le restanti tre sono state invece mantenute in condizioni fisiologiche ed usate come i rispettivi controlli (Tabella 4.1). L'esperimento è stato condotto in duplicato. La concentrazione 7 µg/mL di cisplatino è stata scelta tramite MTT ed esprime la vitalità cellulare.

Ai vari intervalli di tempo, il terreno di coltura è stato raccolto e le cellule sono state staccate con una soluzione di tripsina 0.5% e EDTA 0.2% e centrifugate a 1200 rpm per 5 min. Per eliminare i residui di FBS, 100 µl di DMEM/F-12 sono

stati aggiunti al pellet cellulare, che è stato quindi ricentrifugato a 1200 rpm per 5 min e risospeso in 15 μ l di DMEM F-12.

Tabella 4.1. Disegno sperimentale e gruppi cellulari analizzati: cellule staminali tumorali di OSCC.		
Time point	Trattamento	
	Ctrl	Cisplatino
16hr	ctrl_16hr	cisPt_16hr
24hr	ctrl_24hr	cisPt_24hr
48hr	ctrl_48hr	cisPt_48hr

4.3 Test di vitalità cellulare

Per determinare la vitalità cellulare, è stato impiegato un test colorimetrico in grado di stimare la quantità di cellule vitali in una popolazione cellulare. Il test si basa sull'impiego del Trypan Blue (Sigma-Aldrich), un colorante che non viene assorbito da cellule aventi membrana intatta, ma che penetra invece in cellule danneggiate, colorandole in maniera intensa. Queste ultime assumono una colorazione bluastra se osservate al microscopio a luce visibile, mentre le cellule vitali rimangono trasparenti. Le cellule sono state, poi, contate al microscopio con la camera di Burker.

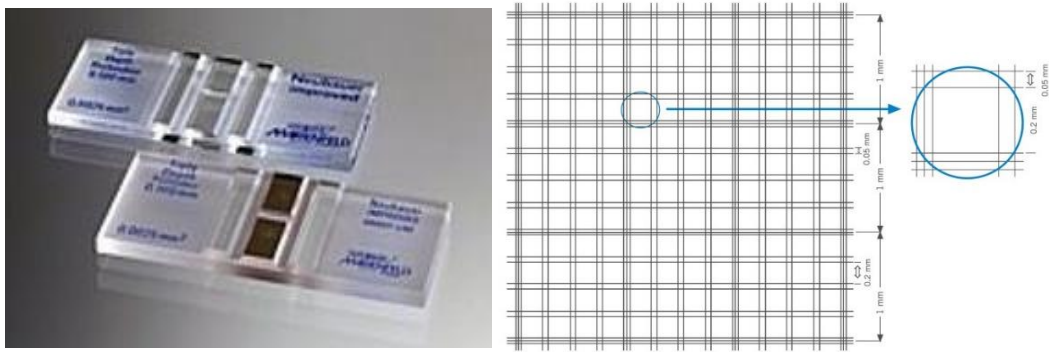


Figura. 4.1. Camera di Burker.

La metodica seguita per il test di vitalità è di seguito riportata. Ulteriori 6 aliquote di CSC derivate da OSCC-G3 (*ca.* 200.000 cellule), sono state seminate in piastre da 6-well e trattate come descritto nel paragrafo 4.2. Le cellule, dopo il trattamento ai suddetti intervalli di tempo, sono state lavate due volte con 5 ml di una soluzione salina sterile D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) e staccate con tripsina 0.5% e EDTA 0.2% in PBS. Trascorsi 3 minuti in incubatore a 37°C, la tripsina è stata inattivata con l'aggiunta di 9 ml di terreno completo al 10% FBS. Dopo accurata risospensione delle cellule contenute nella fiasca, la sospensione cellulare è stata trasferita in una provetta Falcon da 15 ml e centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. In una eppendorf sono stati preparati 100 µl di Trypan Blue Solution 0.4%, diluito 1:1 in D-PBS, ai quali sono stati aggiunti 100 µl della sospensione cellulare appena preparata. Dopo aver mescolato delicatamente per permettere al colorante di penetrare nelle cellule morte, 100 µl di sospensione cellulare sono stati trasferiti nella camera di

Burker fino a riempirla completamente per capillarità. Sono state contate le cellule contenute in nove riquadri con triplo confine. Poiché ogni riquadro rappresenta un volume totale di 10^{-4} cm³, la concentrazione cellulare/ml è stata calcolata mediante la formula di seguito riportata (N, numero di cellule contate; 9, numero di quadrati; 2, fattore di diluizione; 10, volume totale di terreno, e 10^4 fattore di

conversione):
$$\text{Cell}_{\text{tot}} = \frac{N}{9} \times 2 \times 10 \times 10^4$$

In Tab. 4.2 vengono riportate le percentuali di cellule vive e morte.

Tabella 4.2. Dati relativi al test MTT		
CELLULE	VIVE (%)	MORTE (%)
ctrl_16	93	7
ctrl_24	75	25
ctrl_48	92	8
cisPt_16	42	58
cisPt_24	18	82
cisPt_48	5	95

4.4 Analisi FTIRM e pre-processing spettrale

L'analisi FTIRM è stata effettuata presso la beamline SISSI, Elettra –Sincrotrone, Trieste, utilizzando un interferometro Bruker Vertex 70 accoppiato a un

microscopio Hyperion 3000 Vis-IR e con un detector MCT (HgCdTe) raffreddato con azoto liquido e operante nella regione spettrale $4000-800\text{ cm}^{-1}$ (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germania). L'analisi spettrale è stata effettuata su sei gruppi cellulari: le cellule staminali tumorali CSC derivanti dalle cellule primarie di OSCC -G3 con e senza cisplatino, a 16, 24 e 48 ore (Tab.4.1).

Da ciascun campione sono stati prelevati $5\ \mu\text{l}$ di sospensione cellulare e caricati in un dispositivo per microfluidica in CaF_2 (spessore dei supporti in CaF_2 $0.5\ \text{mm}$ e spessore dell'intercapedine interna $7.5\ \mu\text{m}$), appositamente costruito presso la beamline SISSI, Elettra –Sincrotrone Trieste, per l'analisi FTIR *in vitro* di campioni cellulari (Fig. 4.2) (Giorgini *et al.*, 2018).

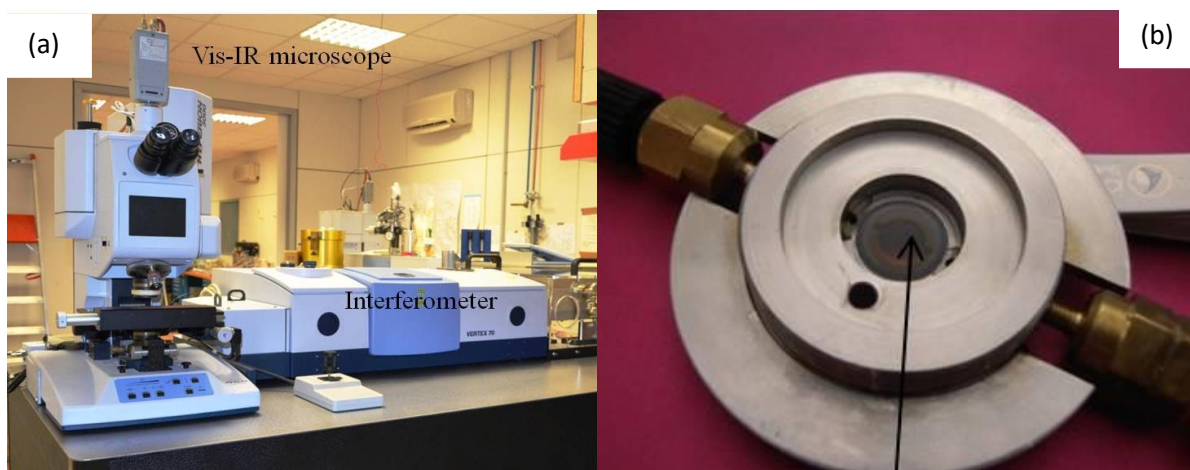


Figura 4.2. (a) Interferometro Bruker Vertex 70 accoppiato con un microscopio Hyperion 3000. (b) Cella microfluidica per analisi di cellule *in vitro*.

Una volta confinate all'interno del chip, le cellule sono state analizzate come segue senza ulteriori trattamenti. Per ciascun campione, tramite la telecamera, sono state scelti 100 gruppi di 2/3 cellule ciascuno ($40 \times 40 \mu\text{m}^2$), più 10 punti corrispondenti al buffer (DMEM F-12), su cui sono stati acquisiti gli spettri IR in trasmissione (256 scansioni, risoluzione spettrale 4 cm^{-1} , range spettrale $4000\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$, velocità di scansione 40 kHz). Lo spettro del background in aria è stato acquisito su un secondo supporto in CaF_2 privo del campione, usando gli stessi parametri.

Sugli spettri IR acquisiti per ogni campione sono state applicate le procedure di Atmospheric Compensation e Offset Correction (software OPUS 7.0, Bruker Optics GmbH) per eliminare i contributi dovuti al biossido di carbonio e al vapore acqueo e quindi si è effettuata la sottrazione dello spettro del buffer tramite un apposito algoritmo *hopetobelucky* su Matlab (Fig. 4.3).

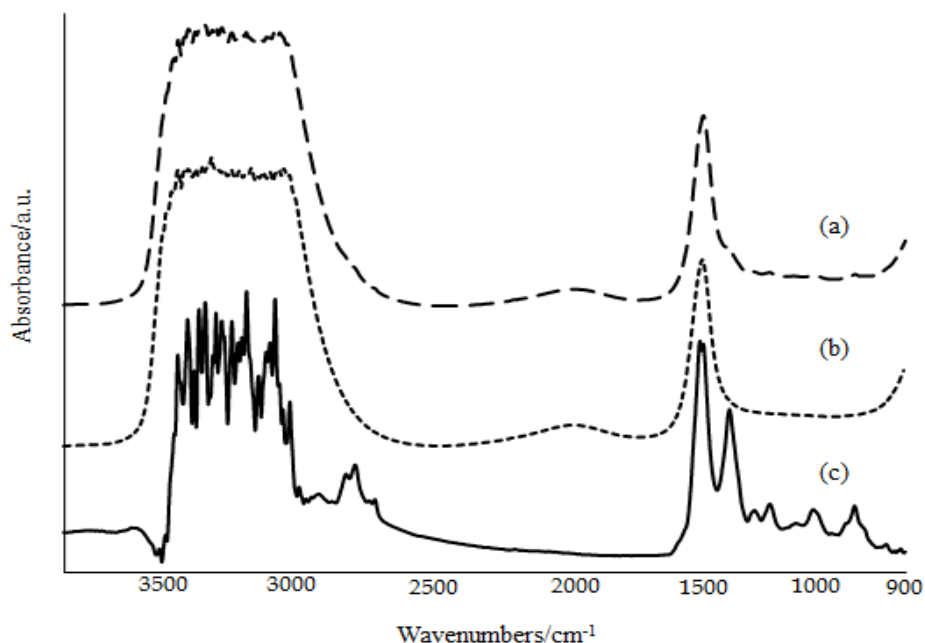


Figura 4.3. Spettri IR dei seguenti campioni: (a) buffer, (b) cellule più buffer e (c) cellule a cui è stato sottratto il buffer.

4.5 Analisi multivariata

Gli spettri pre-processati di tutti i gruppi sperimentali sono stati trasformati in derivata seconda e analizzati quindi tramite analisi multivariata (Principal Component Analysis, PCA) utilizzando il software OriginPro 2018b (OriginLab Corporation). La PCA è una procedura matematica che trasforma un numero di variabili correlate in un numero (più piccolo) di variabili non correlate chiamate componenti principali. Gli *scores* della componente principale possono essere descritti come loading vector, tramite cui viene spiegata questa varianza. In un

contesto di spettroscopia, gli *scores* sono rappresentativi dei valori del loading, che a sua volta indica le variazioni spettrali del dataset. Questo metodo risulta essere molto utile per separare gli spettri in gruppi e per ricostruire i cosiddetti “diagramma di varianza” (Byrne *et al.*, 2016).

4.6 Analisi univariata

Su tutti gli spettri di ogni campione, è stata calcolata l'area dei seguenti intervalli spettrali (OPUS 7.0): 3000-2830 cm^{-1} (modi vibrazionali dei lipidi, **LIP**), 1780-1705 cm^{-1} (modi vibrazionali degli acidi grassi, **FA**), 1595-1483 cm^{-1} (modi vibrazionali delle proteine, Amide II, **AII**), 1483-1433 cm^{-1} (catene alchiliche dei lipidi e delle proteine, **CH2-CH3**), 1433-1371 cm^{-1} (modi vibrazionali dei gruppi carbossilato degli aminoacidi, **COO**), 1272-1185 cm^{-1} (stretching asimmetrico dei gruppi fosfato, **PH1**), e 1145-1031 cm^{-1} (stretching simmetrico dei gruppi fosfato e modi vibrazionali dei carboidrati, **PH2-CARBO**). La somma delle aree sottese agli intervalli spettrali 3000-2830 cm^{-1} e 1780-900 cm^{-1} è stata considerata come rappresentativa del contenuto cellulare complessivo (TOT). I valori numerici ottenuti sono stati, quindi, utilizzati per calcolare specifici rapporti di banda. I dati, riportati come media \pm deviazione standard (S.D.), sono stati analizzati con il test one-way ANOVA, seguito dal Multiple Range Test ($P < 0.05$).

Per ogni campione è stato calcolato anche lo spettro medio, su cui è stata applicata la normalizzazione vettoriale e la correzione della linea di base (metodo Rubberband, 16 punti di baseline) nell'intero range spettrale. La regione spettrale 1350-900 cm^{-1} relativa ai modi vibrazionali degli acidi nucleici, fosfati e carboidrati, è stata analizzata tramite la procedura di Peak Fitting (Grams AI 9.1, Galactic Industries, Inc., Salem, New Hampshire), che permette di individuare in presenza di bande convolute, tutte le sottobande componenti, in termini di posizione, area, altezza e ampiezza. Il numero e la posizione di tali bande componenti sono stati definiti tramite l'analisi dello spettro in Derivata Seconda. La procedura ha fornito le aree sottese alle singole bande, che sono state poi utilizzate per calcolare specifici rapporti di banda.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente lavoro di tesi, sono stati studiati gli effetti citotossici del cisplatino su una coltura cellulare di cellule staminali tumorali (CSC) derivanti da biopsia del carcinoma squamocellulare del cavo orale di grado 3 (OSCC-G3). A tale proposito, 3 aliquote di cellule staminali tumorali di OSCC-G3 sono state trattate con 7 $\mu\text{g/mL}$ di cisplatino per 16, 24 e 48 ore (cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr); altre 3 aliquote di CSC, considerate come gruppi di controllo, sono state coltivate per gli stessi time point senza trattamento chemioterapico (ctrl_16hr, ctrl_24hr e ctrl_48hr). L'esperimento è stato condotto in duplicato. Tutti i campioni sono stati analizzati tramite Microspettroscopia FTIR; i dati spettrali sono stati analizzati mediante analisi multivariata e univariata.

5.1 Analisi Multivariata

I dati spettrali acquisiti sono stati sottoposti a analisi PCA (Principal Component Analysis). Con l'utilizzo della PCA sono stati creati dei diagrammi a dispersione a coppie per gli spettri ctrl_16hr/cisPt_16hr, ctrl_24hr/cisPt_24hr e

ctrl_48hr/cisPt_48hr. L'analisi degli scores plot indica una buona separazione delle popolazioni cellulari ctrl_24hr/cisPt_24hr (Fig. 5.1B), mentre nessuna segregazione è stata osservata in ctrl_16hr/cisPt_16hr e ctrl_48hr/cisPt_48hr (Fig. 5.1A e 5.1C). L'analisi dei loadings ha permesso di evidenziare differenze spettrali fra le popolazioni cellulari nelle seguenti bande di assorbimento: 2960 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (assegnati alle catene alchiliche lipidiche); 1740 cm^{-1} (assegnato ai gruppi di estere dei fosfolipidi); 1460 cm^{-1} e 1396 cm^{-1} (assegnati alle proteine e ai lipidi); 1240 cm^{-1} e 1220 cm^{-1} (assegnati ai fosfolipidi e agli acidi nucleici); 1170 cm^{-1} , 1054 cm^{-1} e 1025 cm^{-1} (assegnati ai carboidrati); 1120 cm^{-1} e 994 cm^{-1} (assegnati all'RNA); 1085 cm^{-1} (assegnati agli acidi nucleici);, e 970 cm^{-1} (assegnati al DNA).

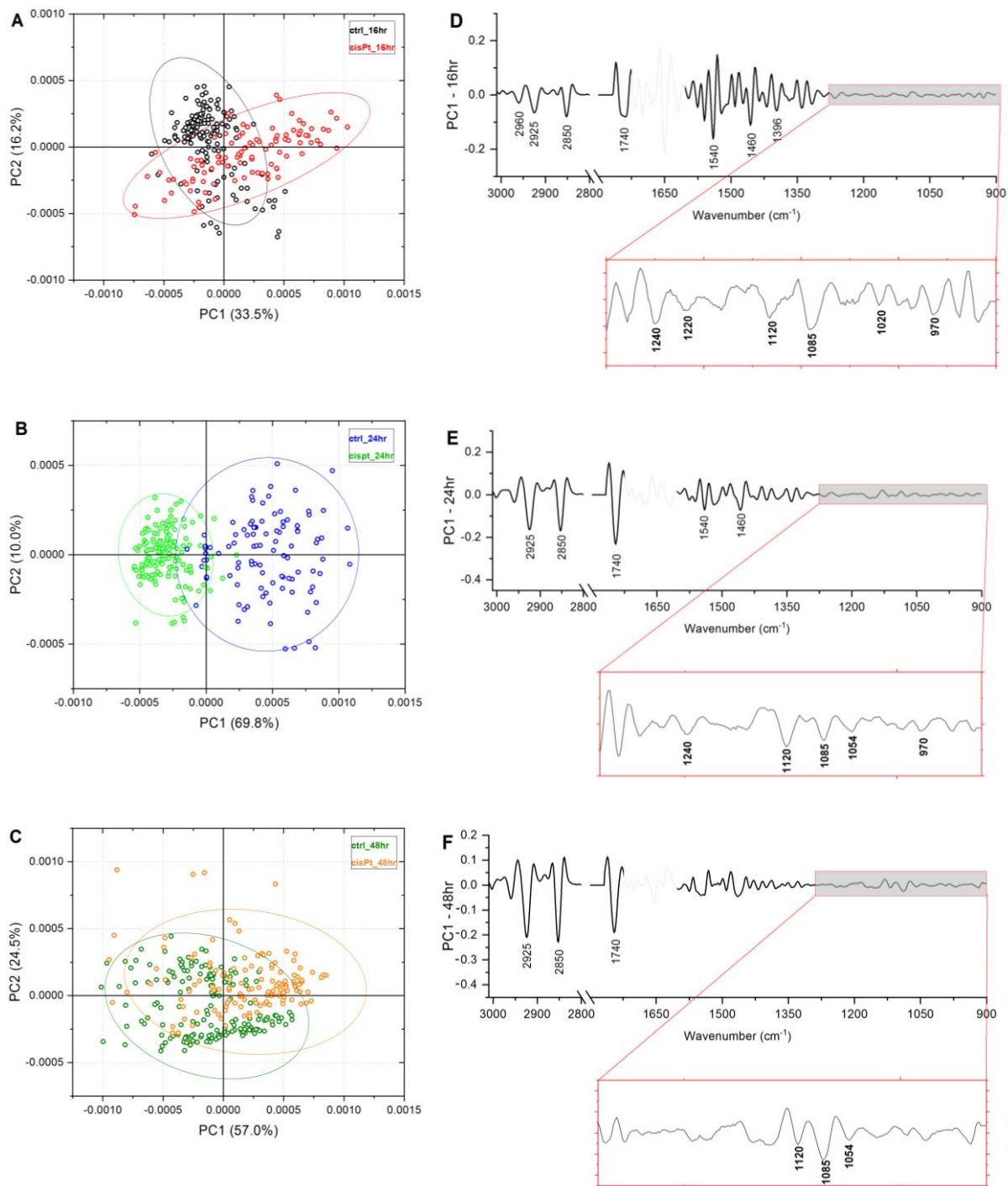


Figura 5.1 Analisi multivariata dei dati FTIRM. Diagramma di dispersione PCA a coppie calcolate per gli spettri (A) ctrl_16hr/cisPt_16hr, (B) ctrl_24hr/cisPt_24hr e (C) ctrl_48hr/cisPt_48hr. Analisi dei loadings relativi alle popolazioni cellulari (D) ctrl_16hr/cisPt_16hr, (E) ctrl_24hr/cisPt_24hr e (F) ctrl_48hr/cisPt_48hr.

5.2 Analisi Univariata

Per quantificare le alterazioni biochimiche indotte dal cisplatino sulle cellule staminali tumorali CSC, per ogni gruppo sperimentale sono stati calcolati lo spettro medio con i relativi spettri medi \pm spettro deviazione standard, riportati in assorbanza (Figura 5.2A) e in derivata seconda (Figura 5.2B).

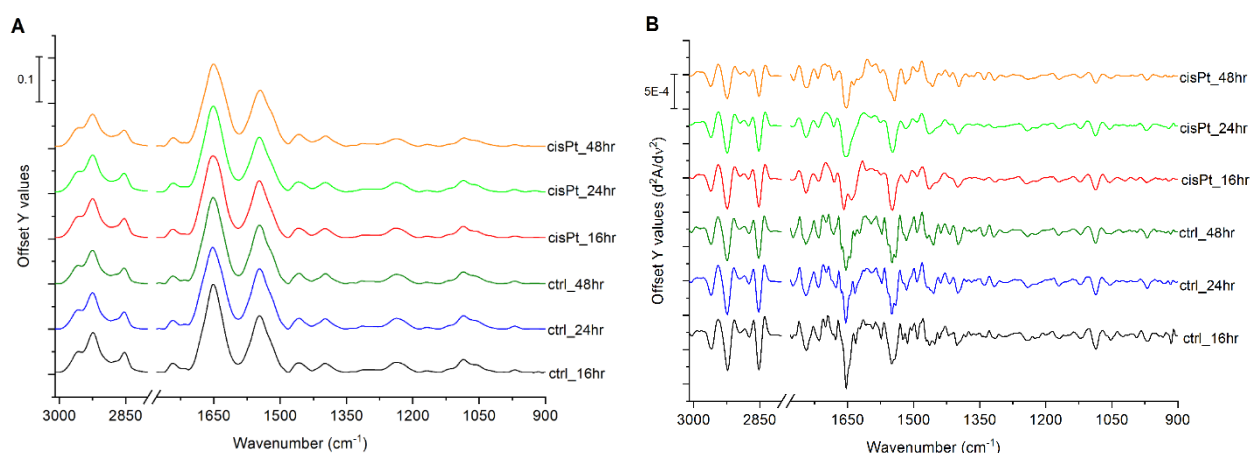


Figura 5.2 Spettri medi dei campioni ctrl_16hr, ctrl_24hr, ctrl_48hr, cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr riportati in: (A) assorbanza, e (B) derivate seconda (3010-900 cm⁻¹). Per una migliore visione, gli spettri sono spostati lungo l'asse y.

Tutti gli spettri medi sono stati sottoposti a procedura di peak fitting nelle regioni spettrali 3050-2800 cm⁻¹ e 1350-900 cm⁻¹ per individuare l'esatta posizione e l'area di tutte le sottobande componenti (Tabella 5.1).

Tabella 5.1 Posizione delle principali bande identificate tramite peak fitting, con relativo significato biologico.	
Posizione (cm⁻¹)	Significato biologico
~2960	gruppi CH ₃ delle catene alchiliche dei lipidi
~2925, ~2850	gruppi CH ₂ delle catene alchiliche dei lipidi
~1240	gruppi fosfato del A-DNA
~1220	gruppi fosfato del B-DNA
~1170	gruppi C-C, C-O-C e C-OH nei carboidrati
~1120	RNA
~1085	gruppi fosfato negli acidi nucleici
~1054	gruppi C-OH nei carboidrati
~1025	gruppi di CH ₂ -OH nei carboidrati
~994	C-C, C-O e RNA ribosomiale
~970	DNA

I seguenti rapporti di area di banda sono stati calcolati e analizzati statisticamente mediante analisi One-Way Anova: 2925/2960, 1240/TOT, 1220/TOT, 1170/TOT, 1085/TOT, 1054/TOT, 1020/TOT, 994/TOT, 970/TOT.

Le CSC trattate con il cisplatino hanno mostrato un'alterazione generale che ha interessato la componente lipidica nelle regioni spettrali 3050-2800 cm⁻¹.

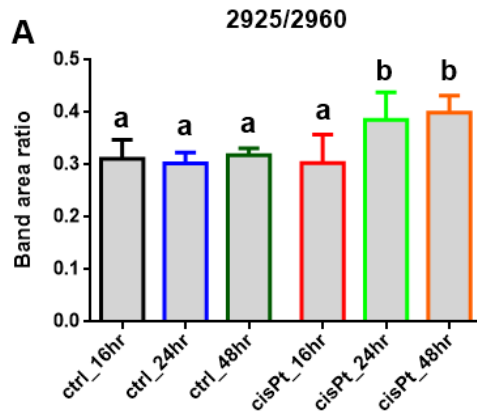


Figura 5.3 Analisi statistica del rapporto di banda delle aree 2925/2960 calcolato per ctrl_16hr, ctrl_24hr, ctrl_48hr, cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr. Le lettere sopra gli istogrammi indicano una differenza statisticamente significativa tra i gruppi (test di confronto multiplo ANOVA a senso unico e Tukey). La significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$.

Il rapporto di area di banda 2925/2960 (catene alifatiche lipidiche) aumenta significativamente nelle CSC trattate con cisplatino a 24 e 48 ore (FIG 5.3). Questo risultato potrebbe essere attribuibile all'insorgenza di un processo di apoptosi.

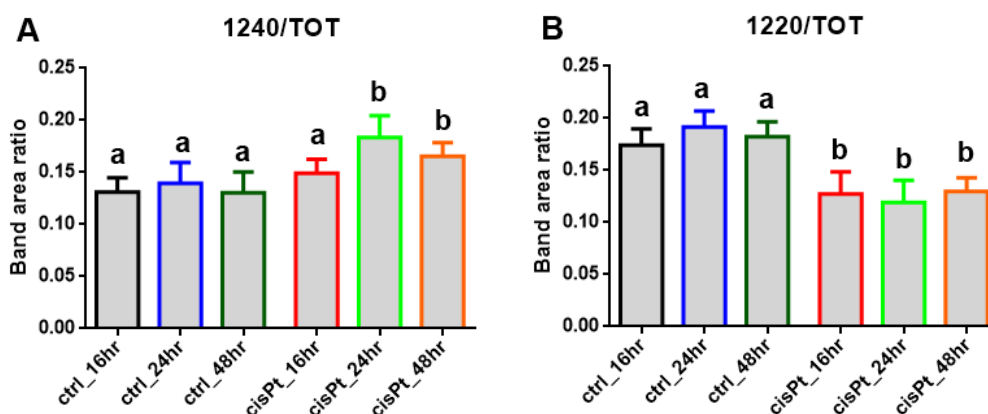


Figura 5.4 Analisi statistica dei rapporti di banda delle aree 124/TOT e 1220/TOT calcolati per ctrl_16hr, ctrl_24hr, ctrl_48hr, cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr.

I rapporti di area di banda a 1220 e 1240 cm^{-1} mostrano cambiamenti significativi tra i gruppi di controllo ed i gruppi trattati con cisplatino.

In particolare, non è stato rilevato alcun cambiamento significativo nel rapporto di area di banda 1240/TOT (vibrazioni dei gruppi fosfato non coinvolti in legami H, tipici della forma A del DNA) tra i gruppi sperimentali di controllo, mentre un aumento significativo è stato riscontrato in cisPt_24hr e cisPt_48hr e meno significativo in cisPt_16hr (Fig.5.4A). Al contrario, nel rapporto di area di banda 1220/TOT (vibrazioni dei gruppi fosfato coinvolti in legami H, tipici della forma B del DNA), i tre gruppi trattati hanno mostrato una significativa diminuzione rispetto ai gruppi di controllo, che non hanno evidenziato alterazioni tra loro (Fig

5.4B). Dall'analisi delle bande a 1240 cm^{-1} (A-DNA) e 1220 cm^{-1} (B-DNA) è possibile rilevare una variazione della conformazione del DNA.

La conformazione B del DNA è tipica delle condizioni di piena idratazione, quindi il passaggio del DNA da una conformazione B ad una conformazione A potrebbe essere determinata da una condizione di disidratazione che determina uno shift del picco da 1220 a 1240 cm^{-1} . Tuttavia, in questo lavoro di tesi, le cellule sono state mantenute in condizioni di idratazione, per cui le alterazioni delle intensità delle bande a 1240 e 1220 cm^{-1} possono derivare dalla presenza di legami H tra i gruppi fosfato e da una maggiore compattezza strutturale degli acidi nucleici.

La transizione da B- ad A-DNA si verifica anche durante i trattamenti farmacologici, soprattutto con i composti intercalanti, che interrompono l'accoppiamento di base e determinano lo spostamento del DNA verso le forme A più disordinate.

I rapporti di area delle bande $1085/\text{TOT}$ (acidi nucleici) e $970/\text{TOT}$ (DNA a doppio filamento) confermano quanto sopra riportato (Fig.5.5).

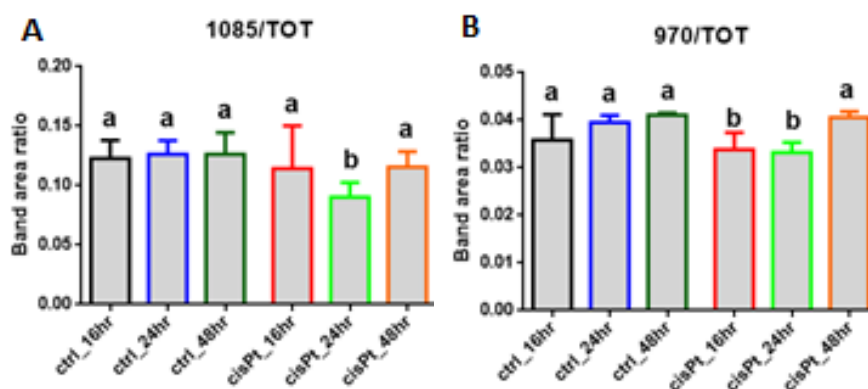


Figura 5.5 Istogrammi che mostrano la variazione numerica dei seguenti rapporti di area di banda calcolati per ctrl_16hr, ctrl_24hr, ctrl_48hr, cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr: 1085/TOT (A), 970/TOT (B).

In particolare, il rapporto di banda a 1085/TOT diminuisce significativamente in cisPt_24hr, mentre non evidenzia alcun cambiamento significativo nei gruppi trattati a 16 e 48 ore (Fig 5.5A). Il rapporto di banda 970/TOT diminuisce in cisPt_16hr e cisPt_24hr. Il trattamento con il cisplatino, invece, non sembra mostrare differenze statisticamente significative con il corrispondente gruppo di controllo (Fig 5.5B).

Questi andamenti spettrali confermano la modalità d'azione intercalante del farmaco in esame, che si lega covalentemente al DNA, bloccando i processi di duplicazione e trascrizione e determinando, infine, la morte cellulare.

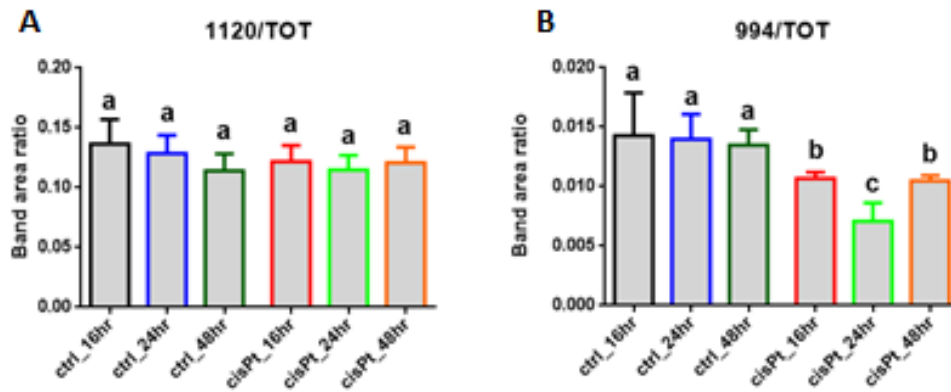


Figura 5.6 Istogrammi che mostrano la variazione numerica dei seguenti rapporti di area di banda calcolati per ctrl_16hr, ctrl_24hr, ctrl_48hr, cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr: 1120/TOT (A), 994/TOT (B).

I rapporti di area di banda relativi all'RNA (1120/TOT e 994/TOT) non hanno mostrato lo stesso andamento tra i gruppi sperimentali: non è stata osservata alcuna alterazione significativa del rapporto 1120/TOT (Figura 5.6A), sia tra i controlli che tra i trattati, mentre il rapporto 994/TOT ha mostrato una evidente diminuzione nei campioni di cellule trattate con cisplatino, in particolare, nel campione cisPt_24hr (Figura 5.6B). Questo risultato suggerisce una diminuzione dell'attività trascrizionale nelle CSC trattate con il cisplatino, probabilmente attribuibile al misfolding e alla frammentazione del DNA precedentemente evidenziati.

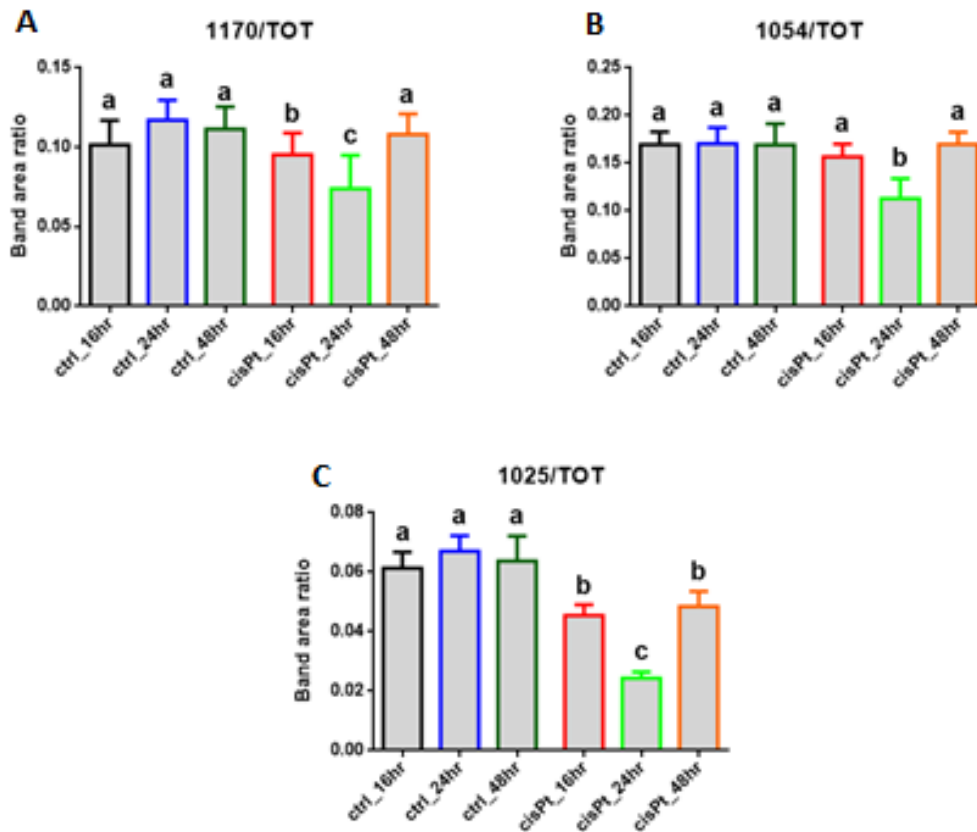


Figura 5.7 Istogrammi che mostrano la variazione numerica dei seguenti rapporti di area di banda calcolati per ctrl_16hr, ctrl_24hr, ctrl_48hr, cisPt_16hr, cisPt_24hr e cisPt_48hr: 1170/TOT (A), 1054/TOT (B) e 1025/TOT (C).

Per quanto riguarda l'andamento dei carboidrati, il rapporto di area di banda 1170/TOT (gruppi C-C, C-O-C e C-OH nei carboidrati) ha mostrato una significativa diminuzione nei gruppi cellulari cisPt_16hr e cisPt_24hr, con valori notevolmente più bassi a 24 ore; a 48 ore di trattamento, invece, le CSC trattate hanno mostrato valori del rapporto 1170/TOT comparabili a quelli del controllo (Fig 5.7A). Lo stesso tipo di andamento è stato osservato per il rapporto di area di

banda 1054/TOT (gruppo C-OH nei carboidrati) che ha evidenziato una diminuzione statisticamente significativa solo in seguito a 24 ore di trattamento (Fig 5.7B). Il rapporto di area della banda 1025/TOT (gruppi CH₂-OH nei carboidrati) ha mostrato un andamento analogo a quello del rapporto di banda 1170/TOT, con una diminuzione significativa in tutte le cellule trattate, soprattutto nel campione cisPt_24hr e, con valori comparabili a 16 e 48 ore di trattamento (Fig 5.7C).

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di analizzare gli effetti del trattamento con il cisplatino sulle cellule staminali tumorali (CSC) del carcinoma squamocellulare orale di grado 3 (OSCC-G3). L'obiettivo è stato quello di evidenziare possibili anomalie nella risposta delle CSC rispetto alle colture cellulari primarie di OSCC-G3 e comprendere le cause di recidive dopo esser stati sottoposti a chemioterapie.

L'analisi statistica multivariata, (PCA), e univariata, (ANOVA), hanno permesso di evidenziare importanti alterazioni spettrali che rivelano come il trattamento con il cisplatino sia molto incisivo a 24 ore e comparabile a 16 e 48 ore.

Dall'analisi dei rapporti di banda relativi alle diverse componenti cellulari è stato possibile ottenere le seguenti informazioni: (a) il trattamento con il cisplatino contribuisce a modificare la conformazione del DNA; (b) ciò conduce ad una frammentazione del DNA, con conseguente riduzione dell'attività trascrizionale e apoptosi cellulare.

Questi risultati potrebbero essere utili nella comprensione del meccanismo di chemioresistenza delle CSC e rappresentare un valido punto di partenza per lo studio di trattamenti mirati al controllo dell'insorgenza di recidive.

Bibliografia

Abdullah L.N., Chow E.K. *Mechanism of chemoresistance in cancer stem cell.* Clinical and Translation Medicine. 2013;1-9.

Afify S.M. and Seno M. *Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation.* Cancer (Basel). 2019; 11(3):345.

Alderden R.A., Hall M.D and Hambley T.W. *The Discovery and Development of Cisplatin.* Journal of Chemical Education. 2006; 83, 5, 728.

Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. *Cancer stem cells: problems for therapy?* Journal of Pathology 2011;223(2):147-61.

Anastassopoulou J., Boukaki E., Conti C., Ferraris P., Giorgini E., Rubini C., Sabbatini S., Theophanides T., Tosi G. *Microimaging FT-IR spectroscopy on pathological breast tissues.* Vibrational Spectroscopy. 2009; Vol 51, Pag 270-275.

Baillie R., Tan S.T. and Itinteang T. *Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review*. *Frontiers in Oncology*. 2017; 2; 7:112.

Battle E., Clevers H. *Cancer stem cells revisited*. *Nat Med*. 2017;23(10): 1124-1134.

Bedolla D., Kenig S., Mitri E., Paola S., Vaccari L. *Further insights into the assessment of cell cycle phases by FTIR microspectroscopy*. *Vibrational Spectroscopy*. 2014; Vol 75, Pag 127-135.

Byrne H.J., Knief P., Keating M.E. and Bonnier F. *Spectral pre and post processing for infrared and Raman spectroscopy of biological tissues and cells*. *Chemical Society Reviews*. 2016; 45, 1865-1878.

Conti C., Ferraris P., Garavaglia M., Giorgini E., Rubini C., Sabbatini S., Tosi G. *Microimaging FTIR of head and neck tumors*. *Microscopy Research and Technique*. 2009;72(2):67-75.

Crupi V., Magazù S., Majolino D., Migliardo P., Venuti V. and Bellissent-Funeld. *Confinement influence in liquid water studied by Raman and neutron scattering*. Journal of Physics. 2000; Vol 12, Num 15.

Da Silva G.N., De Camargo E.A., Favero Salvadori D.M. *Toxicogenomic Activity of Gemcitabine in Two TP53-mutated Bladder Cancer Cell Lines: Special Focus on Cell Cycle-Related Genes*. Molecular Biology Reports. 2012;39(12):10373-82.

Dasari S. and Tchounwou P.B. *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. European Journal of Pharmacology. 2014; Vol 740, Pag 364-378.

Diem M., Romeo M., Matthäus C., Miljkovic M., Miller L. and Lasch P. *Comparison of Fourier transform infrared (FTIR) spectra of individual cells acquired using synchrotron and conventional sources*. Infrared Physics & Technology. 2004; Vol 45, Pag 331-338.

Döbrossy L. *Epidemiology of Head and Neck Cancer: Magnitude of the Problem.*

Cancer Metastasis Reviews. 2005; 24(1):9-17.

Fu T., Hsieh I., Cheng J., Tsai M., Hou Y., Lee J., Liou H., Huang S., Chen H., Yen L., Tseng H., Ger L. *Association of OCT4, SOX2, and NANOG Expression With Oral Squamous Cell Carcinoma Progression.* Journal of Oral Pathology & Medicine. 2016; 45(2):89-95.

Gazi E., Baker M., Dwyer J., Lockyer N.P., Gardner P., Shanks J.H., Reeve R.S., Hart C.A., Clarke N.W., Brown M.D. *A correlation of FTIR spectra derived from cancer biopsies with Gleason grade and tumour stage.* European Urology Journal. 2006; 50:750–761.

Giorgini E., Sabbatini S., Rocchetti R., Notarstefano V., Rubini C., Conti C., Orilisi G., Mitri E., Bedolla D.E. and Vaccari L. *In vitro FTIR microspectroscopy analysis of primary oral squamous carcinoma cells treated with cisplatin and 5-fluorouracil: a new spectroscopic approach for studying the drug–cell interaction.* Analyst. 2018; 143, 3317-3326.

Goodsell DS. *The molecular perspective: Cisplatin*. Stem Cells. 2006; 24:514–515.

Green DM, Marfatia KA, Crafton EB, Zhang X, Cheng X, Corbett AH. *Nab2p is required for poly(A) RNA export in Saccharomyces cerevisiae and is regulated by arginine methylation via Hmt1p*. Journal of Biological Chemistry. 2002; 8;277(10):7752-60.

Jackson K., Pederson M.R., Porezag D., Hajnal Z. and Frauenheim T. *Density-functional-based predictions of Raman and IR spectra for small Si clusters*. Physical Review B. 1997; 55, 2549.

Jamin N., Dumas P., Moncuit J., Fridman W., Teillaud J., Carr J.L. and Williams G.P. *Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry*. PNAS. 1998; 95 (9) 4837-4840.

Johnson J.Z., Hockemeyer D. *Human stem cell-based disease modeling: prospects and challenges*. Current Opinion in Cell Biology. 2015; Vol 37, Pag 84-90.

Jordan C.T., Ph.D., Guzman M.L and Noble M. *Cancer stem cells*. National England Journal of Medicine. 2006; 355(12):1253-61.

Kneipp J., Lasch P., Baldauf E., Beekes M., Naumann D. *Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2000; Vol 1501, Pag 189-199.

Kuşoğlu A., Biray Avcı C. *Cancer stem cells: a brief review of the current status*. Gene. 2019; 681:80-85.

Milano G, Palmerini C. *La rivoluzione delle cellule staminali*. Milano: Feltrinelli Editore; 2005.

Naumann D., Fijala V., Labischinski H., Giesbrecht P. *The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis.* Journal of Molecular Structure. 1988; Vol 174, Pag 165-170.

Prieto-Vila M., Takahashi R., Usuba W., Kohama I. and Ochiya T. *Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche.* International Journal of Molecular Sciences. 2017, 18(12), 2574.

Rich J.N. *Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity.* Medicine (Baltimore). 2016; 95(1 Suppl 1): S2-7.

Rosenberg B., Krigas T., Van Camp L. *Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.* Nature. 1965; Vol 205, Pag 698-699, 1965.

Sagar J., Chaib B., Sales K., Winslet M. and Seifalian A. *Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review*. *Cancer Cell International*. 2007; 7: 9.

Schmidt, F., Efferth, T. *Tumor heterogeneity, single-cell sequencing, and drug resistance*. *Pharmaceuticals*. 2016; 9(2), 33.

Shaw R.A., Mantsch H.H. *Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis*. *Biomedical Spectroscopy*. 2006.

Stuart H.B., Ando D.J. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. *Analytical Chemistry by Open Learning*. 1997.

Sulé-Suso J., Skingsley D., Sockalingum G.D., Kohler A., Kegelaer G., Manfait M., Haj A.J. *FT-IR microspectroscopy as a tool to assess lung cancer cells response to chemotherapy*. *Vibrational Spectroscopy*. 2005; Vol 38, Pag 179-184.

Vargas-Ferreira F., Nedel F., Etges A., Neutzling Gomes A.P., Furuse C., Chaves Tarquinio S.B. *Etiologic Factors Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma in Non-Smokers and Non-Alcoholic Drinkers: A Brief Approach*. Brazilian Dental Journal .2012;23(5):586-90.

Walsh M.J., German M.J., Singh M., Pollock H.M., Hammiche A., Kyrgiou M., Stringfellow H.F., Paraskevaidis E., Martin-Hirsch P.L., *Martin F.L. IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening*. Cancer Letters. 2007; Vol 246, Pag 1-11.

Wang Q., Sanad W., Miller L.M., Voigt A., Klingel K., Kandolf R., Stangl K., *Gert Baumann. Infrared imaging of compositional changes in inflammatory cardiomyopathy*. Vibrational Spectroscopy. 2005; Vol 38, Pag 217-222.

Wang X., Ge S., McNamara G., Hao Q., Crooks G.M., Nolte J.A. *Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells*. Blood. 2003; 101 (10): 4201–4208.

Weiss R.B., Christian M.C. *New cisplatin analogues in development. A review.* *Drugs.* 1993; 46:360–377.