



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale  
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**ATTIVITA' IPOMETILANTE DELLA 5-AZACITIDINA IN  
CELLULE STAMINALI TUMORALI DEL CAVO ORALE: ANALISI  
FTIRM**

**HYPOMETHYLATING ACTIVITY OF 5-AZACYTIDINE IN ORAL  
CANCER STEM CELLS: FTIRM ANALYSIS**

Tesi di Laurea Magistrale  
di:  
Di Millo Sabrina

Relatore  
Chiar.mo Prof.ssa  
Giorgini Elisabetta

Correlatore  
Prof.ssa  
Sabbatini Simona  
Dott.ssa  
Notarstefano Valentina

**Sessione Straordinaria  
Anno Accademico 2018/2019**

## *Indice*

---

<b>Introduzione</b>	1
---------------------	---

### **Capitolo primo**

<b>1. Tumore squamocellulare del cavo orale</b>	
1.1 Definizione generale	5
1.2 Carcinoma squamocellulare del cavo orale	6
1.3 Cellule staminali tumorali da OSCC	7
1.4 Resistenza ai farmaci nelle CSC	12

### **Capitolo secondo**

<b>2. Molecole ad attività ipometilante</b>	
2.1 Metilazione del Dna ed epigenetica	15
2.2 Farmaci ipometilanti	16
2.3 5-azacitidina: proprietà e meccanismi d'azione	19

### **Capitolo terzo**

<b>3. Microspettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier</b>	
3.1 Principi generali	23
3.2 Bande di assorbimento dei principali componenti cellulari	26

## **Capitolo quarto**

### **4. Parte sperimentale**

4.1 Preparazione delle colture cellulari primarie di OSCC	31
4.2 Arricchimento con le cellule staminali tumorali	32
4.3 Trattamento chemioterapico dei gruppi sperimentali A e B	33
4.4 Test di vitalità cellulare	35
4.5 Analisi FTIRM e pre-processing spettrale	37
4.6 Analisi multivariata	39
4.7 Analisi univariata	40

## **Capitolo quinto**

### **5. Risultati e discussione**

5.1 Analisi multivariata	42
5.2 Analisi vibrazionale e univariata	45

## **Capitolo sesto**

<b>6. Conclusioni</b>	<b>58</b>
-----------------------	-----------

<b>Bibliografia</b>	<b>62</b>
---------------------	-----------

<b>Ringraziamenti</b>	<b>71</b>
-----------------------	-----------

# INTRODUZIONE

---

L'epigenomica è lo studio delle variazioni dell'espressione genica dovute a processi epigenetici e non ad alterazioni della sequenza base dell'acido desossiribonucleico (DNA). I meccanismi chiave della regolazione epigenetica comprendono la metilazione del DNA, le modifiche dell'istone e gli RNA non codificanti. Le alterazioni epigenetiche nel cancro sono principalmente legate all'ipermetilazione dei promotori dei geni soppressori del tumore, all'ipometilazione globale del DNA e all'aumentata espressione delle deacetilasi istoniche (HDAC). Vi è una crescente necessità di studiare modelli epigenetici e di fornire strategie terapeutiche innovative, sicure ed efficaci per i pazienti oncologici, che non mostrano miglioramenti a seguito dei tradizionali trattamenti antitumorali.

A tutt'oggi, si conoscono due classi di farmaci, approvati per uso clinico: gli inibitori della DNA metiltransferasi (DNMT), come la 5-azacitidina e la decitabina, e gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC), come il vorinostat e la romidepsina, che bloccano le reazioni enzimatiche rispettivamente della DNMT e HDAC, contribuendo al silenziamento epigenetico trascrizionale dei geni mutati.

Nonostante studi empirici abbiano definito la chemioterapia come il trattamento con migliore efficacia terapeutica, anche i pazienti in cui esso è ben tollerato possono andare incontro ad una progressione della patologia o a ricadute proprio a causa dello sviluppo di cellule staminali tumorali resistenti ai farmaci.

E' diffusa ormai da decenni la teoria secondo cui all'interno della massa cancerosa è possibile distinguere una piccola popolazione di cellule in grado di dividersi e auto-rinnovarsi, differenziandosi, poi, nelle diverse tipologie cellulari. Tali cellule, note come *cancer stem cells* (CSC) sono una popolazione di cellule ad elevata potenza tumorigenica, che si distinguono per la spiccata tendenza a diffondere il tumore e l'elevata refrattarietà alle cure. Per questo motivo, si ritiene che le CSC siano in grado di iniziare e sostenere la crescita del tumore, e che siano responsabili dell'eventuale comparsa di recidive e metastasi.

La resistenza terapeutica è mediata dall'acquisizione di quiescenza, dall'aumentata riparazione del DNA, dalla riduzione dell'apoptosi e dall'interazione tra CSC e il loro microambiente di supporto, la nicchia.

La Microspettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FTIRM) viene da tempo applicata con successo per studiare aree molto piccole di campioni biologici seccati all'aria o fissati secondo protocolli ben definiti, con una

preparazione minima del campione e senza l'uso di coloranti o sonde. Tale tecnica spettroscopica è stata applicata per analizzare campioni biotici prelevati da pazienti affetti da diverse patologie tumorali: analizzando sia i profili spettrali sia specifici rapporti di banda, è possibile rilevare interessanti modifiche nella loro composizione biochimica, riconducibili al metabolismo lipidico, alle diverse conformazioni del DNA, al contenuto e al folding proteico. La spettroscopia FTIRM è considerata anche un valido strumento per l'analisi di campioni cellulari sottoposti a trattamenti farmaceutici; con una minima preparazione del campione e con una unica acquisizione è possibile ottenere informazioni sulla composizione biochimica delle cellule analizzate. Ciò permette di evidenziare modifiche nel pattern proteico e lipidico del campione ed in particolare nel metabolismo dei lipidi e nella struttura secondaria delle proteine, variazioni nella conformazione ed integrità degli acidi nucleici, la presenza di stress ossidativo e di processi apoptotici. Recentemente, lo sviluppo di speciali dispositivi microfluidici, biocompatibili e trasparenti alla radiazione infrarossa, ha consentito di ampliare il campo di applicazione di questa tecnica spettroscopica, permettendo lo studio di colture cellulari *in vitro*, mantenute in soluzione fisiologica durante l'acquisizione e non sottoposte a nessun tipo di trattamento o fissaggio.

Conservare le cellule tumorali nel loro ambiente di coltura, permette di ottenere

un'enorme quantità d'informazioni spettrali e di fare uno screening biochimico sulla loro struttura macromolecolare (proteine, acidi nucleici, lipidi) e sui relativi processi metabolici.

Partendo da tali presupposti, è stata utilizzata la spettroscopia FTIRM per l'analisi *in vitro* di campioni di cellule sia primarie che staminali, ottenute da biopsie di carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC) e trattate con 5-azaciditina per 24 e 48 ore. Lo scopo della tesi è stato valutare il meccanismo di azione e la citotossicità di questo agente ipometilante sulle due tipologie di cellule (differenziate e non) in modo da (1) individuare i possibili markers spettrali identificativi carcinoma squamocellulare del cavo orale e (2) valutare possibili differenze nella risposta delle cellule tumorali primarie e staminali a tale molecola.

# TUMORE SQUAMOCELLULARE DEL CAVO ORALE

### *1.1 Definizione generale*

Sebbene il cancro esista da oltre un milione di anni nella specie umana, non sono state raggiunte cure efficaci per la maggior parte dei tumori. Il cancro è chiaramente una malattia complessa mediata da numerosi percorsi molecolari e cellulari. Lo schema generale degli eventi che causano il cancro può essere riassunto nella acquisizione da parte delle cellule di mutazioni genetiche che portano ad un'espressione genica alterata e quindi alla trasformazione della cellula normale in una cellula cancerosa, generando così il tumore.

Man mano che il tumore cresce, si verificano numerosi eventi a livello del metabolismo cellulare; a causa della condizione anossica, si osserva anche la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) che possono diventare aggressivi e iniziare a migrare e a invadere le membrane cellulari, portando alla fine le metastasi in altri tessuti. Una volta che i tumori si sono metastatizzati, il processo può continuare e alla fine portare alla morte.



Molti dei percorsi che modulano i processi associati ai diversi tumori sono conservativi e quindi esiste una considerevole sovrapposizione tra i diversi tumori; ciò ha permesso di sviluppare precise terapie contro il cancro, con un considerevole miglioramento dell'aspettativa di vita dei malati oncologici (Patterson *et al.*,2018).

### ***1.2 Carcinoma squamocellulare del cavo orale***

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 L., 2005).

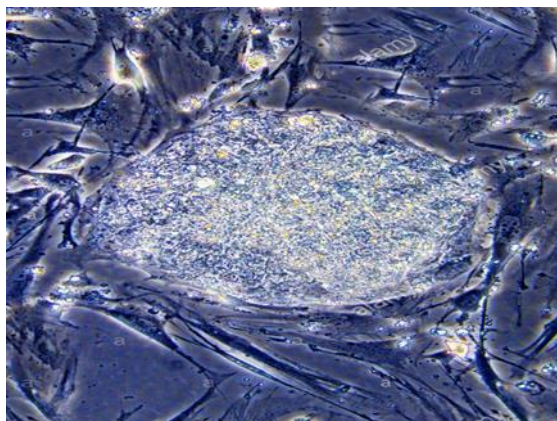
Le sedi d'insorgenza del tumore del cavo orale sono strettamente correlate all'esposizione a diversi fattori di rischio. Le regioni anatomiche più colpite sono, infatti, rappresentate dai pilastri faringei, dal pavimento orale e dalla

lingua, che costituiscono le principali vie di deflusso e di ristagno del cibo, fumo e altri agenti cancerogenici (Green F.G *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 rappresenti 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).

### ***1.3 Cellule staminali tumorali da OSCC***

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 radio terapeutici (Sagar *et al.*, 2007). In Figura 1.1. si riporta un esempio di cellule staminali embrionali.



**Figura 1.1.** Cellule staminali embrionali umane  
(<https://www.alamy.com/stock-photo-human-embryonal-stem-cell-as-seen-through-light-microscope-16869072.html>).

Le cellule staminali sono cellule non specializzate presenti in tutti gli organismi viventi e sono caratterizzate da tre proprietà (Jhonson *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.

La diffusione di una neoplasia, invece, dipende da un piccolo numero di cellule staminali circoscritte in una zona ristretta del tumore chiamate cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells, CSC*) (Jordan *et al.*, 2004). Le cellule staminali tumorali (CSC) possono 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.

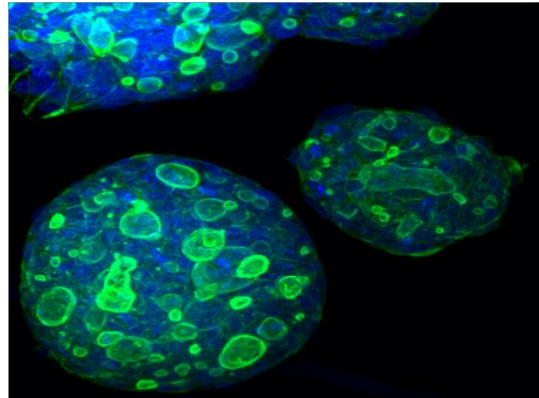
Le CSC sono simili alle cellule staminali normali, in quanto presentano generalmente una forma tondeggianti, ma tendono a formare delle sfere composte da cellule staminali e dalle loro cellule figlie, nel momento in cui vengono messe in coltura. Le cellule tumorali specializzate (adulte), invece, assumono forme diverse a seconda del tessuto in cui si è sviluppato il tumore (Batlle *et al.*, 2017).

Le CSC sono solitamente una minoranza all'interno di un tumore e presentano tre principali caratteristiche (Jordan *et al.*, 2006):

- sono indispensabili per la crescita del tumore perché generano tutte le altre cellule tumorali;

- sono resistenti ai farmaci 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.

Ma come si fa a riconoscere una cellula staminale tumorale? In effetti l'identificazione delle cellule staminali tumorali non è assolutamente facile e quindi è un campo in continua evoluzione, con continue scoperte e smentite alla ricerca di un modo più sicuro e affidabile. Si può ricorrere ad esempio a tecniche particolari che evidenziano 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 (Ranui *et al.*, 2017). Le staminali tumorali vengono anche riconosciute per la loro capacità di espellere velocemente alcune sostanze chimiche o per la presenza di particolari enzimi. Tuttavia, alcuni di questi “segni particolari” cambiano fra tumori di individui diversi e non sono costanti nel tempo.



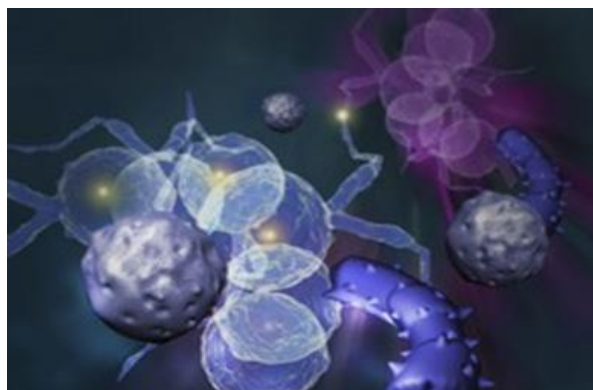
**Figura 1.1.** Cellule staminali tumorali del colon  
(<http://www.airc5x1000staminali.it/it/cosa-sono-le-csc>).

Le cellule staminali tumorali (CSC) sono state identificate anche nel carcinoma squamo cellulare della cavità orale (OSCC), che è 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 luogo 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 singolo marcatore in grado di identificare in modo inequivocabile le CSC (Bradley, 2018).

### ***1.4 Resistenza ai farmaci nelle CSC***

La resistenza ai farmaci rappresenta una sfida continua nel trattamento del cancro ed è senza dubbio la causa principale dell'insuccesso terapeutico. Essa non necessariamente è limitata ad un solo farmaco, ma può riguardare anche un ampio spettro di farmaci (multidrug resistance).

Le CSC sono situate in un microambiente specializzato definito “nicchia”, composto principalmente da fibroblasti e cellule endoteliali, mesenchimali e immunitarie, che svolgono anche ruoli chiave nella resistenza ai farmaci. Tali cellule hanno il compito di promuovere le vie di segnalazione molecolare richieste per il mantenimento e la sopravvivenza delle cellule staminali tumorali e di proteggerle dagli agenti terapeutici.



**Figura 1.3.** Nicchia tumorale  
(<https://thumbs.dreamstime.com/b/cellula-tumorale-37420671.jpg&imgrefurl>).

La ragione principale della resistenza ai farmaci deriva dal diverso comportamento delle stesse CSC rispetto alle cellule staminali normali. Queste ultime, infatti, mantengono il pool genetico di cellule in un organismo e sviluppano diversi meccanismi per evitare la morte da apoptosi e senescenza cellulare. Le CSC, invece, utilizzano questi stessi meccanismi contro le terapie antitumorali e mostrano meccanismi di resistenza endogena contro la radiazione e la chemioterapia molto più alti delle cellule tumorali già differenziate. Questo implica che il trattamento terapeutico riesce ad eliminare la massa di popolazione delle cellule tumorali differenziate e non le CSC, che sono, quindi, altamente tumorigeniche (Prieto-Vila *et al.*, 2017).

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 si possono degradare durante la chemioterapia; se, però, le cellule staminali tumorali non



vengono degradate del tutto, il rischio di recidive potrebbe essere molto alto;

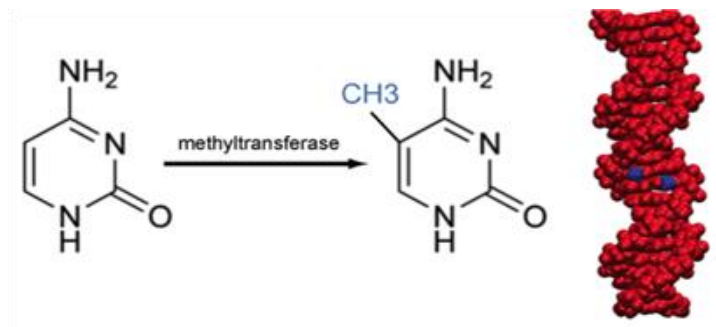
3. le cellule tumorali staminali possono migrare in siti distali dal tumore primario e formare le metastasi.

E' evidente, perciò, l'importanza di mettere a punto delle terapie che abbiano come bersaglio proprio le cellule staminali tumorali 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 ATTIVITA' IPOMETILANTE

### *2.1 Metilazione del Dna ed epigenetica*

Il termine epigenetica deriva dal greco *epi*'(sopra) e *genneticòs* (ereditario): indica un'informazione che non dipende dalla sequenza del DNA, ma dalla sua organizzazione strutturale. La metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico, che rappresenta un'importante modifica dalla quale dipende la regolazione dell'espressione genica ed è stata osservata in varie patologie tumorali (Fig. 2.1.). Essa consiste nell'aggiunta di un gruppo metile alle basi azotate del DNA (guanina, citosina, adenina e tirosina), attraverso un processo catalizzato da una famiglia di enzimi chiamata *metiltransferasi*, che modificano lo stesso DNA, trasformando la cellula sana in cellula tumorale. La sua funzione è, quindi, quella di "silenziare i geni", in quanto determina l'interruzione dei loro processi di trascrizione e di traduzione.



**Figura 2.1.** Meccanismo di azione della metilazione del DNA (<http://it.nextews.com/20110e2f/>).

Le forme di metilazione anomala che si possono osservare sono: ipermetilazione e ipometilazione. L'ipermetilazione è associata all'inattivazione genica: alcuni particolari geni, definiti geni “soppressori tumorali” vengono ipermetilati e di conseguenza inattivati. L'ipermetilazione, quindi, non solo è associata al cancro, ma, in alcuni casi, può diventare la causa stessa della malattia. L'ipometilazione, invece, viene associata al meccanismo d'azione di determinati farmaci antitumorali (Rygiel *et al.*, 2019).

## ***2.2 Farmaci ipometilanti***

I farmaci capaci di modulare l'espressione del DNA possono attivare o inattivare geni la cui funzione è strettamente legata alla patogenesi di una specifica malattia. La metilazione del DNA, per esempio, è causa del cosiddetto “silenziamiento” dei geni onco-soppressori.

Tali geni svolgono un ruolo fondamentale, in quanto evitano che la cellula vada

incontro a una trasformazione tumorale per mezzo della repressione dell'espressione di alcuni geni legati al controllo della divisione cellulare. Tale funzione di repressione viene solitamente espletata da geni regolatori che codificano per proteine capaci di legarsi a specifici siti del DNA e inibirne l'espressione. Per cui, una tipologia di agenti chemioterapici attualmente molto studiata è quella dei farmaci ipometilanti, dei quali il principale rappresentante è la 5-azacitidina, che hanno mostrato una notevole efficacia nel trattamento della mielodisplasia (MDS), della leucemia mielo-monocitica cronica (LMMC) e della leucemia mieloide acuta (LMA) (Russo *et al.*, 2014).

I farmaci ipometilanti, quindi, contrastano il processo di ipermetilazione e ripristinano un'attività genica il più vicino possibile a quella normale. In particolare, essi manifestano la loro attività antineoplastica attraverso l'incorporazione nell'RNA, l'interruzione del metabolismo dell'RNA stesso e l'inibizione della metilazione del DNA.

Le strategie di combinazione della manipolazione epigenetica con altri "nuovi" farmaci mirano ad aumentare l'efficacia degli agenti ipometilanti. In particolare, gli inibitori delle deacetilasi istoniche vengono considerati utili partner terapeutici e i risultati preliminari sono promettenti

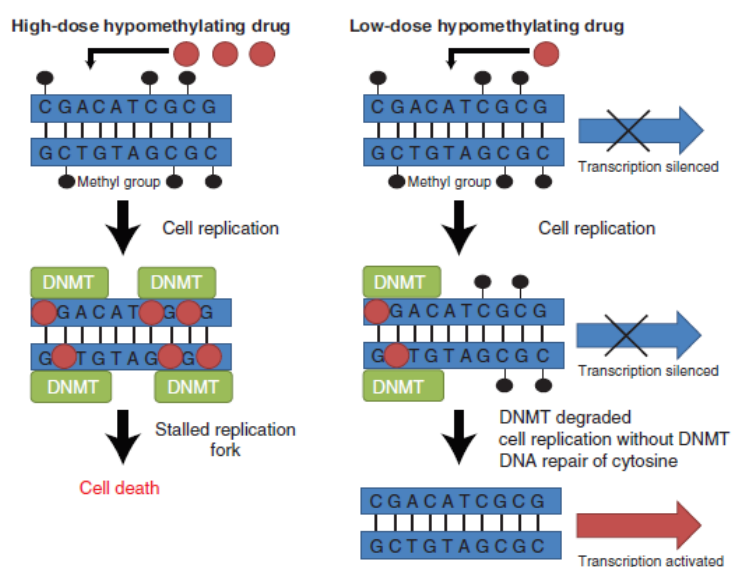
(Müller *et al.*, 2010).

È importante, però, ribadire che i farmaci ipometilanti sono attualmente in fase

di sperimentazione clinica per la terapia del cancro. In base al loro meccanismo di azione, quindi, tali farmaci con attività ipometilante si suddividono in due categorie:

- 1) inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC), come il Vorinostat e la Romidepsina, che bloccano le reazioni enzimatiche delle deacetilasi istoniche, contribuendo al silenziamento epigenetico trascrizionale dei geni mutati (Tiffon *et al.*, 2011);
- 2) inibitori della DNA metiltransferasi (DNMT), come la 5-azacitidina e la Decitabina, sviluppati nel 1960, ma considerati, in origine, farmaci citotossici (Fig. 2.2) (Sato *et al.*, 2017).

La 5-azacitidina e la decitabina sono stati approvati per il trattamento delle sindromi mielodisplastiche (MDS) e della leucemia mieloide acuta. Compromettono la metilazione del DNA inibendo la DNA metiltransferasi, e quindi, possono favorire l'espressione di geni precedentemente silenziati. La riattivazione dei geni che regolano il ciclo cellulare, in particolare, può indurre il differenziamento cellulare e attivare l'apoptosi (Matuschita *et al.*, 2018).



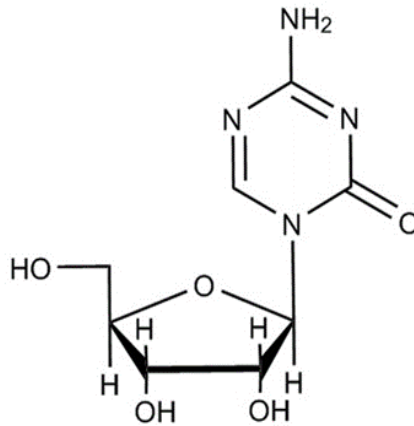
**Figura 2.2.** Confronto degli effetti di alte dosi e basse dosi di farmaci ipometilanti sulle cellule (Sato *et al.*, 2017).

La principale differenza tra i due farmaci è che la decitabina si incorpora solo nel DNA, mentre la 5-azacitidina si può inserire sia nel DNA che nell'RNA (Kuykendall, 2005). La loro introduzione nella terapia antitumorale ha rappresentato, comunque, un importante passo avanti nel trattamento di pazienti con sindromi mielodisplastiche a rischio più elevato, leucemia mielomonocitica cronica e leucemia mieloide acuta (Sato *et al.*, 2017).

### **2.3 5-Azacitidina: proprietà e meccanismi d'azione**

La 5-azacitidina appartiene alla classe degli antimetaboliti, cioè farmaci antitumorali costituiti da sostanze di struttura simile a quella dei normali metaboliti, e quindi in grado di interferire con essi. Essa è un analogo della

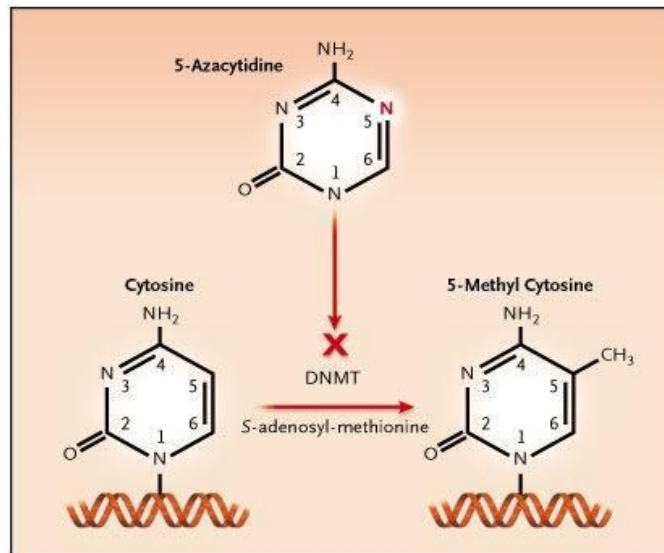
citidina e quindi può essere incorporata nel materiale genetico degli acidi nucleici (DNA e RNA) (Fig. 2.3).



**Figura 2.3.** Struttura della 5-azacitidina  
(<http://bioqdocancer.blogspot.com/2011/11/>).

Il suo meccanismo di azione consiste nel modificare il modo in cui la cellula attiva e disattiva i geni, interferendo con la produzione di nuovi acidi nucleici (Fig. 2.4). In particolare, la 5-azacitidina è un agente che si lega ed inibisce le DNA-metiltransferasi, deputate alla metilazione del DNA di nuova sintesi, ripristinando il controllo di una crescita cellulare. Ciò determina l'ipometilazione dei residui di citosina che induce la differenziazione cellulare attraverso la riespressione di geni silenziati dalla precedente ipermetilazione. Si reputa che tali interventi correggano le anomalie a carico dei globuli

sanguigni nel midollo osseo, causa delle sindromi mielodisplastiche, e che uccidano le cellule cancerose nei casi di leucemia (Vaccaro, 2014).



**Figura 2.4.** Meccanismo di azione della 5-azacitidina (<https://slideplayer.it/slide/549669/>).

La 5-azacitidina è disponibile sotto forma di polvere liofilizzata bianca, che deve essere ricostituita con acqua per iniezione immediatamente prima della somministrazione per ottenere una sospensione di 25 mg / ml. La sospensione di 5-azacitidina deve essere iniettata per via sottocutanea nella parte superiore del braccio, nella coscia o nell'addome. La dose iniziale raccomandata per il primo ciclo di trattamento di 5-azacitidina (per tutti i pazienti indipendentemente dai valori di laboratorio ematologici basale) è di 75 mg/m<sup>2</sup> ogni giorno per 7 giorni, seguito da un periodo di riposo di 21 giorni. I cicli



devono essere ripetuti ogni 4 settimane e nei cicli successivi di trattamento, la dose deve essere aggiustata in base alla risposta ematologica e alla tossicità.

Nonostante gli ottimi risultati terapeutici ottenuti nelle leucemie mieloidi acute negli anni '70, tale farmaco è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration), per il trattamento di tutti i sottotipi di sindromi mielodisplatiche (MDS), soltanto nel 2004, in quanto si è rivelato l'unico in grado di alterare il decorso naturale dell'MDS (Müller *et al.*, 2010).

# 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 (Naumman *et al.*, 1988). Ogni specie batterica è infatti caratterizzata da un'unica ed irripetibile distribuzione di molecole biochimiche e quindi da uno spettro IR particolare e specifico. 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.

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 da cui sono stati asportati (Jackson *et al.*, 1997; Mantsch *et al.*, 2002). Infatti, lo spettro infrarosso può essere paragonato *in toto* all'impronta digitale dell'uomo, ovvero univocamente caratterizzato per unicità e specificità (Mantsch *et al.*, 1990).

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, da artefatti o dalla degenerazione dei suoi componenti per l'insorgere di una malattia (Shaw *et al.*, 2000).

Nel tempo si è arrivati effettivamente a dei risultati molto incoraggianti per numerose tipologie di tumore su un numero elevato di distretti studiati, quali cervello (Kneipp *et al.*, 2000), cervice (Walsh *et al.*, 2007), colon (Conti *et al.*, 2008), endometrio (Alò *et al.*, 2009), cuore (Wang *et al.*, 2005), prostata (Gazi *et al.*, 2006), epidermide (Crupi *et al.*, 2000), tiroide (Liu *et al.*, 2003), 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 (Walsh *et al.*, 2007) 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.

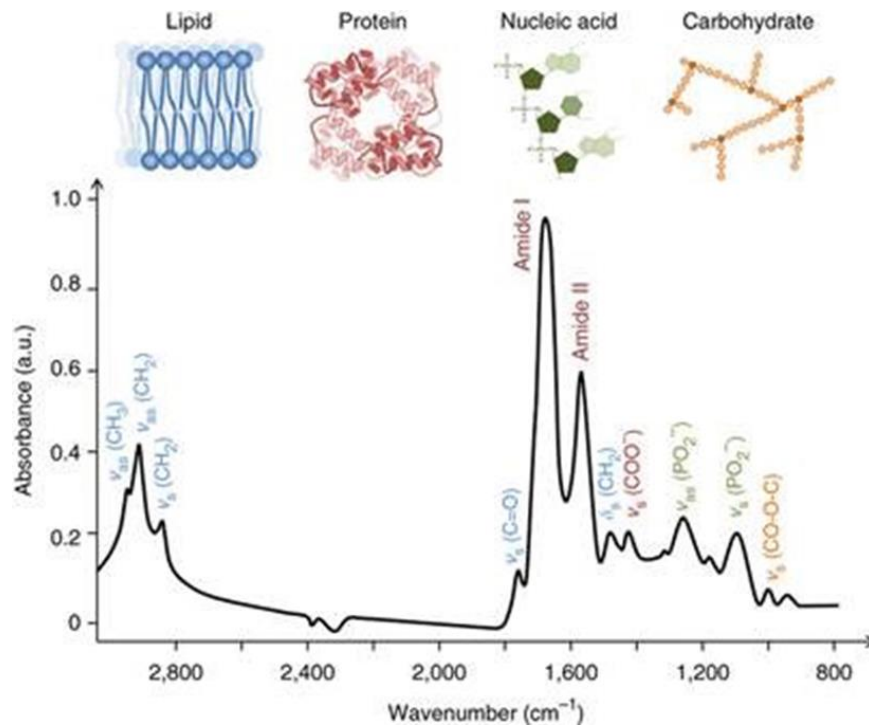
Sono stati condotti studi anche sulla possibilità di collegare lo spettro allo stadio di divisione cellulare, ovvero definire in quale fase della vita (G1, S, G2, M) si trovi la cellula nel momento in cui viene analizzata. Effettivamente ogni fase cellulare è ben distinta e i rispettivi spettri sono 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  $\mu\text{m}$ ), 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).

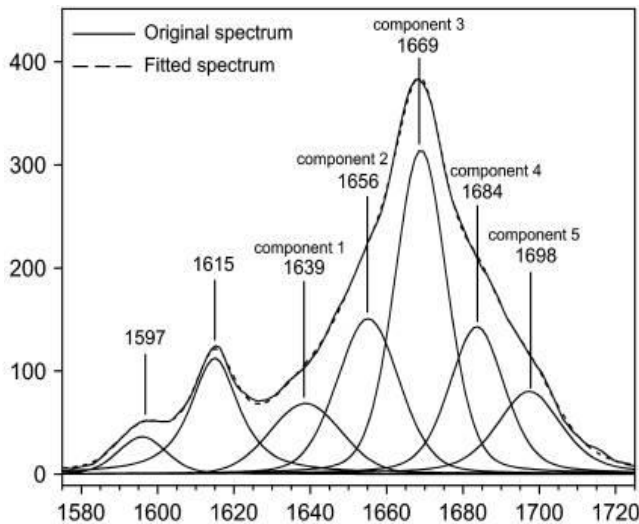


**Figura 3.1.** Spettro IR di un campione biologico e significato biologico delle principali bande.

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<sup>-1</sup>) 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 componenti che possono essere identificate tramite la

procedura di Peak Fitting; ogni sottobanda può essere associata alle varie conformazioni, quali  $\alpha$ -elica,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn e random (Fig. 3.2).



Frequenza (cm <sup>-1</sup> )	Struttura
1695-1670	$\beta$ sheet
1690-1680	$\beta$ sheet
1666-1659	turn helix
1657-1648	$\alpha$ helix
1645-1640	random coil
1640-1630	$\beta$ sheet
1625-1610	$\beta$ sheet

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

- Ammide II ( $\sim 1550$  cm<sup>-1</sup>), 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  $\sim 1400$ ,  $\sim 1310$ ,  $\sim 1290$  e  $\sim 1240$  cm<sup>-1</sup>) 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 ( $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ ), che comprende gli assorbimenti a  $1610$  e  $1578\text{ cm}^{-1}$ , 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 ( $1500-1250\text{ cm}^{-1}$ ), poco visibili;
- componenti vibrazionali dovute alla combinazione fra lo zucchero ed i gruppi fosfato ( $1250-900\text{ cm}^{-1}$ ); i picchi relativi allo stretching asimmetrico e simmetrico del  $\text{PO}_2^-$  si trovano a  $1230$  e  $1089\text{ cm}^{-1}$ , per il DNA, e a  $1244$  e  $1084\text{ cm}^{-1}$  per l'RNA. In più per l'RNA è presente la banda a  $996\text{ cm}^{-1}$  relativa alle vibrazioni dell'uracile.



Lipidi. I fosfolipidi, componenti principali del doppio strato della membrana cellulare, mostrano un assorbimento a  $1730\text{ cm}^{-1}$ , dovuto allo stretching del C=O del legame estereo tra la coda e la testa, e quattro bande nella regione compresa tra  $2800$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , generate rispettivamente dagli stretching simmetrico e asimmetrico dei gruppi metilenici ( $\text{CH}_2$ ) e metilici ( $\text{CH}_3$ ) delle catene degli acidi grassi (Stuart, 1997).

### **PARTE SPERIMENTALE**

Le colture cellulari primarie di OSCC di grado 3, il loro arricchimento con le cellule staminali e il successivo trattamento con la 5-azacitidina sono state ottenute dal Prof. Corrado Rubini e dalla Dott.ssa Romina Rocchetti presso il Laboratorio di Anatomia patologica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, dell'Università Politecnica delle Marche. Di seguito vengono riportate le procedure seguite.

#### ***4.1 Preparazione delle colture cellulari primarie di OSCC***

La coltura primaria utilizzata per lo studio è stata isolata da un carcinoma squamocellulare OSCC di grado 3 della lingua in un paziente maschio di 50 anni. Il tessuto tumorale della biopsia prelevato tramite resezione chirurgica, in condizioni di sterilità, è stato più volte immerso nel terreno di coltura DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), addizionato con la gentamicina 50µg/ml e con il bisturi, è stata effettuata la dissociazione in singoli frammenti di circa 1mm<sup>3</sup>. 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 CO<sub>2</sub>. 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 CO<sub>2</sub>. Le cellule tumorali di OSCC (gruppo sperimentale A) ottenute sono state quindi utilizzate per il trattamento con 5-azacitidina.

#### ***4.2 Arricchimento con le cellule staminali tumorali***

Le cellule tumorali primarie di OSCC di grado 3 sono state 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 linee cellulari OSCC 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 N<sub>2</sub>, 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 (gruppo sperimentale **B**) ottenute sono state quindi utilizzate per il trattamento con 5-azacitidina.

#### ***4.3 Trattamento chemioterapico dei gruppi sperimentali A e B***

Le cellule tumorali primarie di OSCC di grado 3 (gruppo sperimentale **A**) e le corrispondenti cellule staminali tumorali (gruppo sperimentale **B**) sono state divise in 4 aliquote ciascuna (*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% CO<sub>2</sub> a 37°C. Dopo 24 h, due aliquote sono state trattate con 5-azacitidina (3 µM) rispettivamente per 24 e 48 h; le restanti due sono state invece mantenute in condizioni fisiologiche ed usate come i rispettivi controlli (Tabella 4.1).

La concentrazione 3  $\mu$ M di 5-azacitidina è stata scelta tramite test con sale MTT e corrisponde alla concentrazione meglio tollerata dalle cellule tumorali di OSCC.

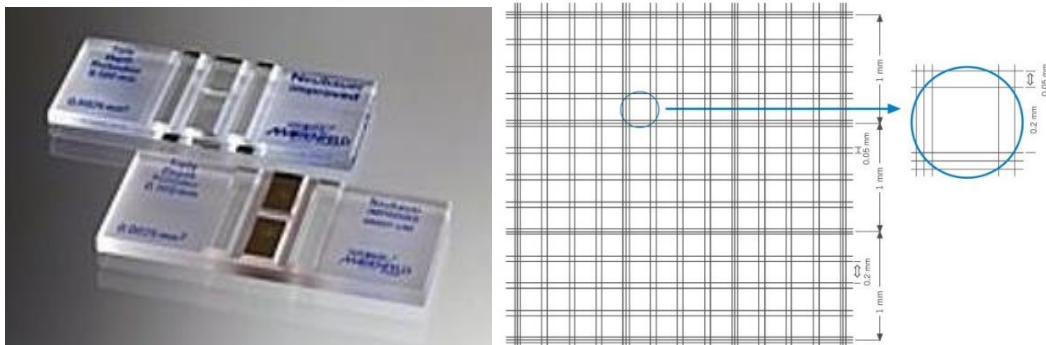
Ai vari intervalli di tempo, il terreno di coltura è stato raccolto e le cellule sono state staccate con una soluzione di tripsina 0,5% e EDTA 0,2% e centrifugate a 1200 rpm per 5 min. Per eliminare i residui di FBS, 100  $\mu$ l di DMEM F-12 sono stati aggiunti al pellet cellulare, che è stato quindi ricentrifugato a 1200 rpm per 5 min e risospeso in 15  $\mu$ l di DMEM F-12.

Per quest'analisi non è stato considerato un tempo successivo alle 48 ore, a causa del raggiungimento della confluenza massima e del conseguente distacco cellulare.

<b>Tabella 4.1.</b> Disegno sperimentale e gruppi cellulari analizzati: cellule tumorali primarie di OSCC di grado 3 ( <b>A</b> ); cellule staminali tumorali di OSCC ( <b>B</b> ).			
		<b>CTRL</b>	<b>5-Azacytidine</b>
<b>A</b>	24h	A_CTRL_24	A_5AZA_24
	48h	A_CTRL_48	A_5AZA_48
<b>B</b>	24h	B_CTRL_24	B_5AZA_24
	48h	B_CTRL_48	B_5AZA_48

#### 4.4 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 bluastro 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. Le cellule, dopo il riscaldamento 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. Poichè ogni riquadro rappresenta un volume totale di 10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>, 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<sup>4</sup> fattore di conversione):

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

In Tab. 4.2 vengono riportati la percentuale di cellule vive e morte.

<b>Tabella 4.2. Dati relativi al test MTT</b>		
<b>CELLULE</b>	<b>VIVE (%)</b>	<b>MORTE (%)</b>
<b>A_CTRL24</b>	<b>93</b>	<b>7</b>
A_5AZA24	75	25
<b>A_CTRL48</b>	<b>92</b>	<b>8</b>
A_5AZA48	54	46
<b>B_CTRL24</b>	<b>95</b>	<b>5</b>
B_5AZA24	72	28
<b>B_CTRL48</b>	<b>90</b>	<b>10</b>
B_5AZA48	52	48

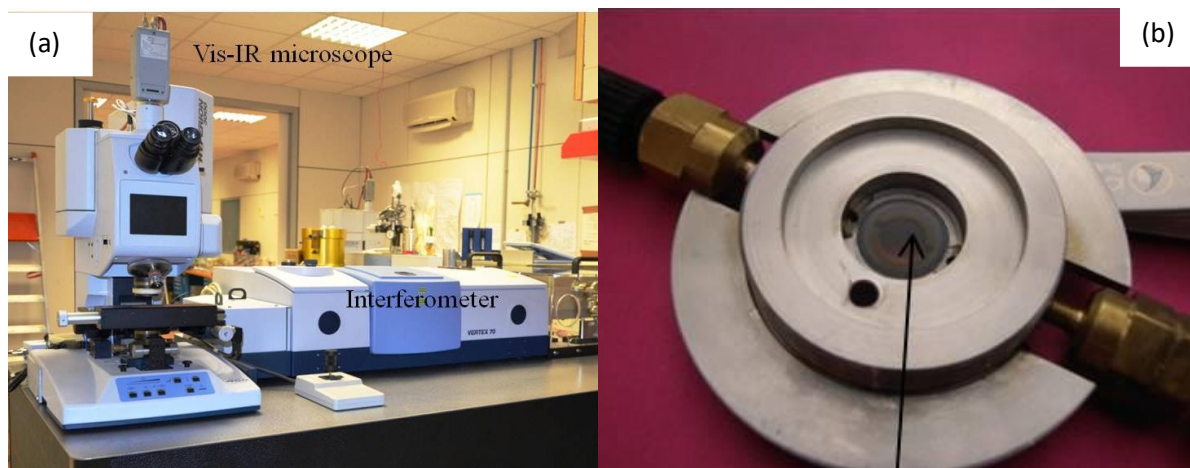
#### ***4.5 Analisi FTIRM e pre-processing spettrale***

L'analisi FTIRM è stata effettuata presso la beamline SISSI, Elettra – Sincrotrone, Trieste, utilizzando un interferometro Vertex 70 accoppiato con un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR e con un detector MCT (HgCdTe) raffreddato con azoto liquido e operante nella regione spettrale 4000-800 cm<sup>-1</sup> (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germania). L'analisi spettrale è stata effettuata su quattro gruppi cellulari: le cellule tumorali di OSCC di grado 3 (A) con e senza 5- azacitidina (a 24 e 48 ore) e le cellule staminali tumorali CSC (B) con e senza 5-azacitidina (a 24 e 48 ore) (Tab.4.1).

Da ciascun campione sono stati prelevati 5 µl di sospensione cellulare e caricati in un dispositivo microfluidico in CaF<sub>2</sub> (spessore dei supporti in CaF<sub>2</sub> 0.5 mm e spessore dell'intercapedine interna 7.5 µm), appositamente costruito presso



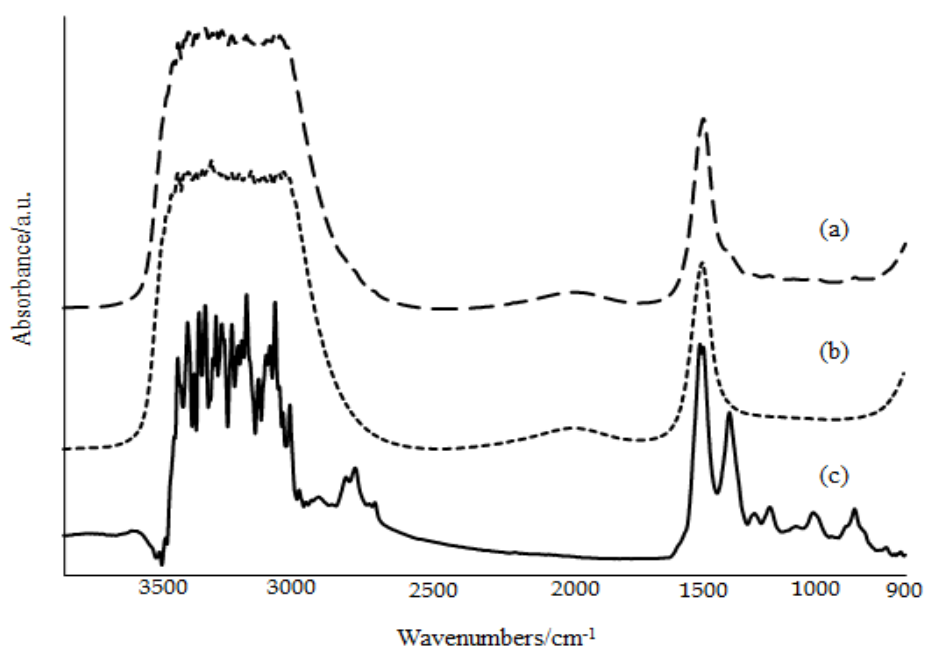
la beamline SISSI, Elettra –Sincrotrone Trieste, per l'analisi FTIR in vitro di campioni cellulari (Fig. 4.2) (Giorgini *et al.*, 2018).



**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  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 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  $\text{CaF}_2$  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 programma *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.

#### ***4.6 Analisi multivariata***

Gli spettri pre-processed 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 (possibilmente) 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 può essere molto utile per fornire un metodo per separare spettri in gruppi ad es. malato e non malato, per ricostruire immagini vale a dire un diagramma di varianza (Byrne *et al.*, 2016).

#### **4.7 Analisi univariata**

Su tutti gli spettri di ogni campione, sono stati calcolati gli integrali (OPUS 7.0) nei seguenti intervalli: 3000-2830  $\text{cm}^{-1}$  (modi vibrazionali dei lipidi, **LIP**), 1780-1705  $\text{cm}^{-1}$  (modi vibrazionali degli acidi grassi, **FA**), 1595-1483  $\text{cm}^{-1}$  (modi vibrazionali delle proteine, Amide II, **AII**), 1483-1433  $\text{cm}^{-1}$  (catene alchiliche dei lipidi e delle proteine, **CH2-CH3**), 1433-1371  $\text{cm}^{-1}$  (modi vibrazionali dei gruppi carbossilato degli aminoacidi, **COO**), 1272-1185  $\text{cm}^{-1}$  (stretching asimmetrico dei gruppi fosfato, **PH1**), e 1145-1031  $\text{cm}^{-1}$  (stretching simmetrico dei gruppi fosfato e modi vibrazionali dei carboidrati, **PH2-CARBO**). La somma delle aree sottese agli intervalli spettrali 3000-2830  $\text{cm}^{-1}$

e 1780-900  $\text{cm}^{-1}$  è stata considerata come rappresentativa del contenuto cellulare complessivo (**CM**). 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 ( $P < 0.001$ ).

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  $\text{cm}^{-1}$  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

### 5.1 Analisi multivariata

Su tutti i campioni cellulari è stata eseguita l'analisi multivariata (PCA). In particolare, in Fig. 5.1 è riportata l'analisi PCA con tutti i gruppi sperimentali: si osserva solo la segregazione dei gruppi sperimentali B\_5AZA24 e B\_5AZA48, entrambi relativi alle cellule staminali CSC trattate con 5-azacitidina, sia rispetto a PC1 che a PC2.

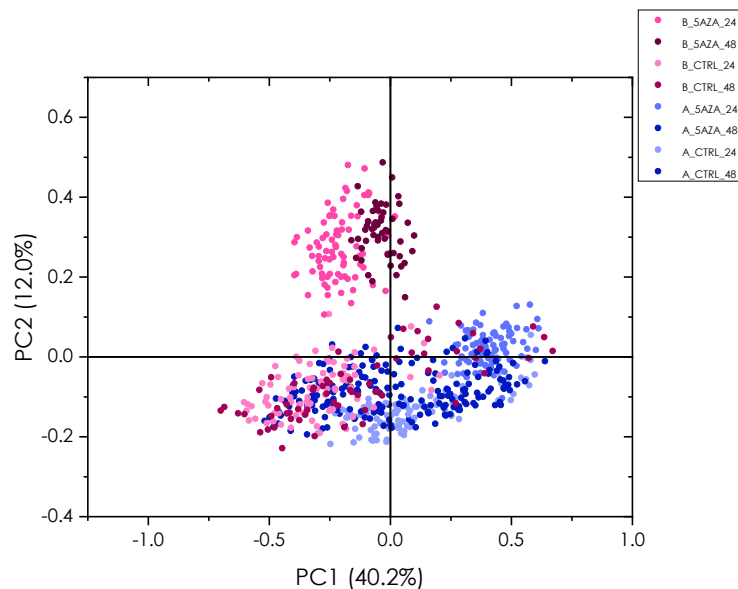


Figura 5.1. Analisi PCA con tutti i gruppi sperimentali (A\_CTRL24, A\_CTRL48, A\_5AZA24, A\_5AZA48, B\_CTRL24, B\_CTRL48, B\_5AZA24, B\_5AZA48).

In Fig. 5.2 sono riportate le PCA pairwise di A\_CTRL24 - A\_CTRL48 e (b) B\_CTRL24 - B\_CTRL48: in entrambi i casi non si osserva nessuna segregazione fra i controlli a 24 e 48 ore.

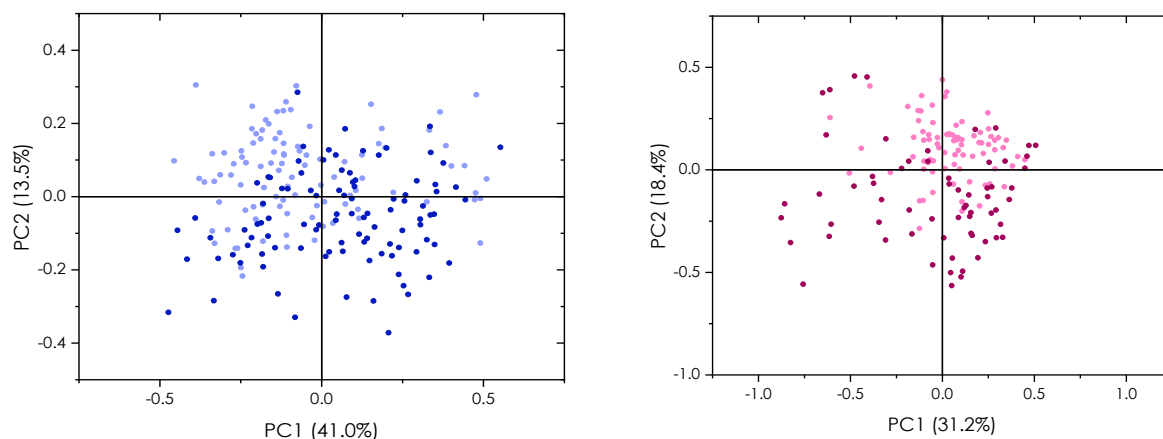
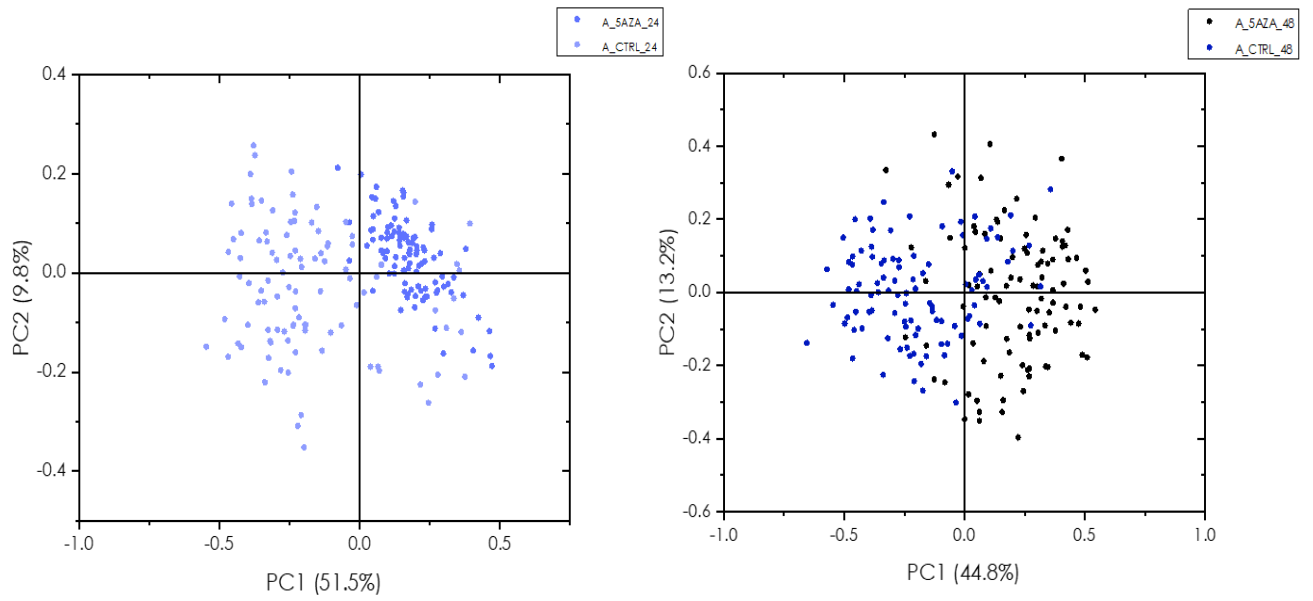
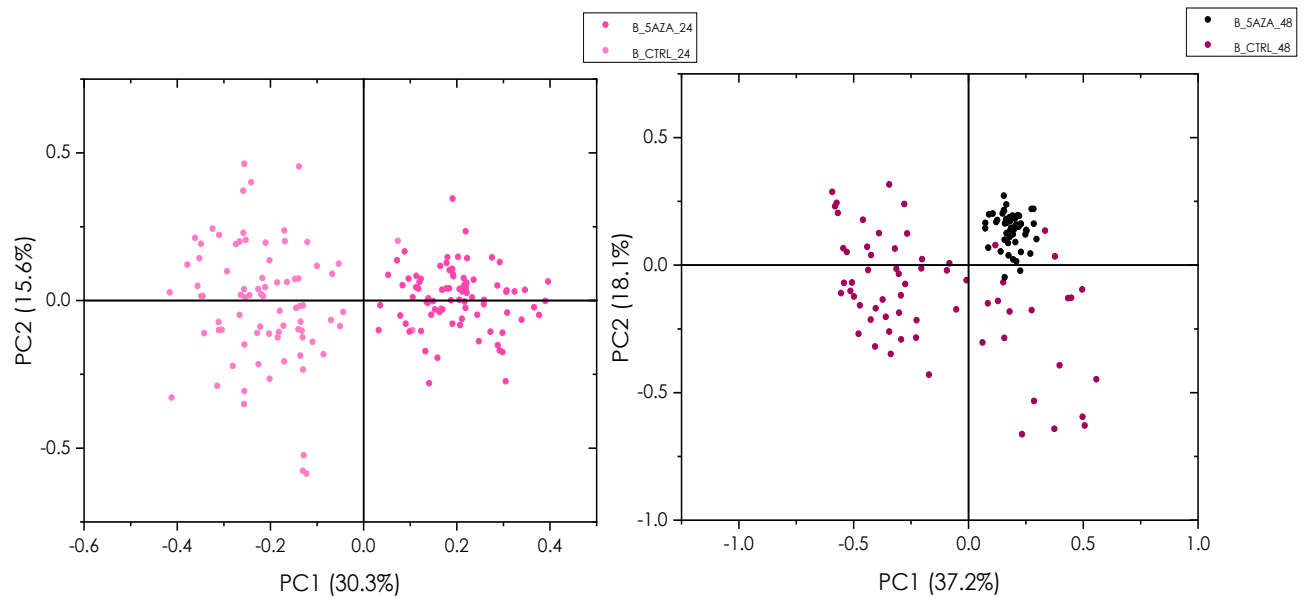


Figura 5.2. PCA di: (a) A\_CTRL24 (celeste)-A\_CTRL48 (blu) e (b) B\_CTRL24 (rosa) -B\_CTRL48 (marrone).

In Fig. 5.3 e 5.4 sono riportate rispettivamente le PCA pairwise effettuate fra i gruppi di controllo A e B e i rispettivi trattati, sia a 24 che a 48 ore. In entrambi i gruppi sperimentali, OSCC (A) e CSC (B), si evidenzia una buona segregazione rispetto a PC1, sia per quanto riguarda il trattamento con 5-azacitidina che il tempo di esposizione.



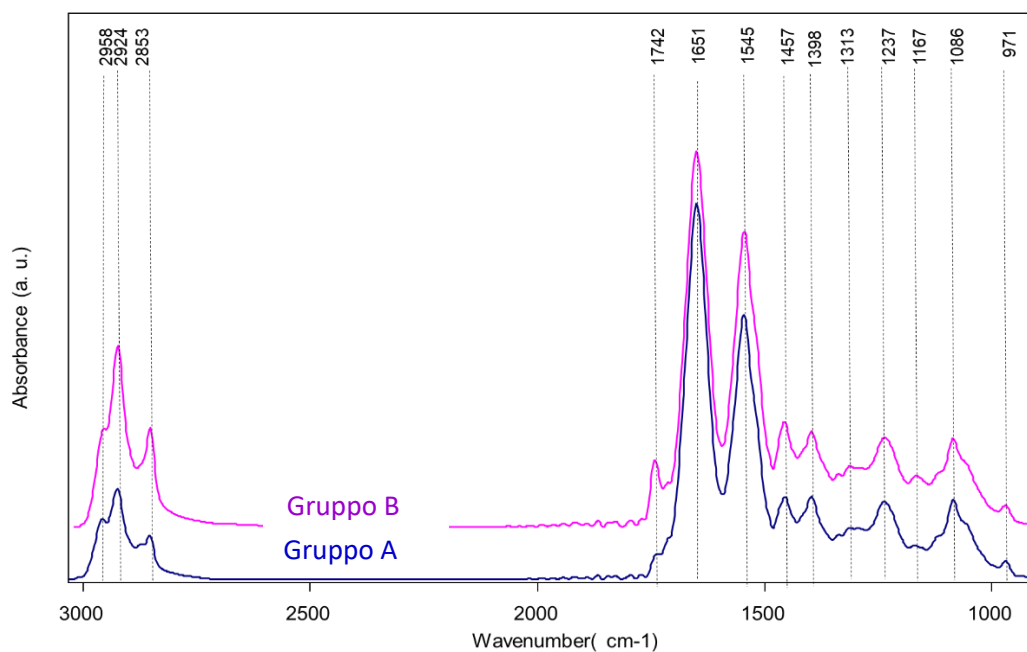
**Figura 5.3.** PCA di: (a) A\_5AZA24-A\_CTRL24 e (b) A\_5AZA48-A\_CTRL48.



**Figura 5.4.** PCA di: (a) B\_5AZA24-B\_CTRL24 e (b) B\_5AZA48-B\_CTRL48.

## 5.2 Analisi vibrazionale e univariata

In Fig. 5.5 sono riportati gli spettri medi delle cellule tumorali OSCC (A) e delle rispettive cellule staminali (B) nell'intervallo spettrale 3050-900  $\text{cm}^{-1}$ . Le principali bande IR (indicate in alto nella figura) sono descritte nella Tabella 5.1, in termini di posizione (numeri d'onda,  $\text{cm}^{-1}$ ), modo vibrazionale e corrispondente significato biochimico.



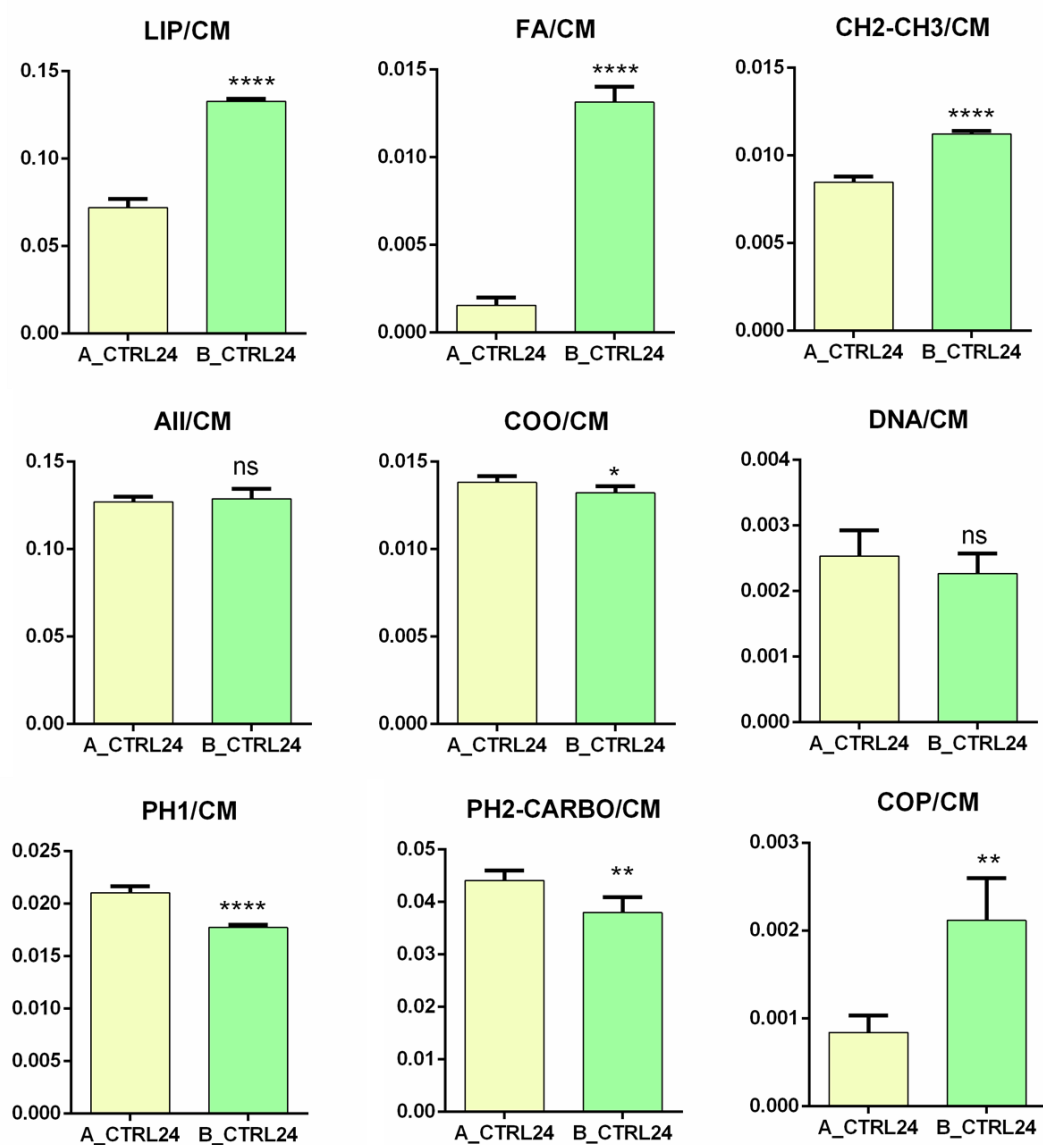
**Figure 5.5.** Spettri IR dei gruppi cellulari A e B a 24 ore senza trattamento. Gli spettri sono riportati nell'intervallo spettrale 3050-900  $\text{cm}^{-1}$  e shiftati lungo l'asse y. La posizione (in termini di lunghezza d'onda) dei picchi IR più significativi è riportata in alto.



**Tabella 5.1.** Principali bande IR identificate negli spettri dei gruppi cellulari A e B: posizione (numero d'onda,  $\text{cm}^{-1}$ ), modo vibrazionale e significato biologico.

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modi vibrazionali	Significato biologico
~ 2958, ~ 2924, ~ 2853	Stretching gruppi alchilici $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$	Catene alchiliche dei lipidi
~ 1742	Stretching C=O estereo	Triacilgliceroli e fosfolipidi
~ 1651	$\nu\text{C}=\text{O}$ , $\delta\text{C}-\text{N}$ , $\delta\text{N}-\text{H}$	Amide I, proteine
~ 1545	$\nu\text{C}-\text{N}$ , $\delta\text{N}-\text{H}$	Ammide II, proteine
~ 1457	Bending gruppi $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$	Catene alchiliche dei lipidi e delle proteine
~ 1398	Stretching $\text{COO}^-$	Aminoacidi
~ 1313	$\nu\text{C}-\text{N}$ , $\delta\text{N}-\text{H}$	Ammide III, proteine
~ 1237, ~ 1086	Stretching dei gruppi $\text{PO}_2^-$	Acidi nucleici
~ 1167	Stretching del gruppo C-OP	Composti fosforilati (marker tumorale)
~ 971	Backbone DNA	DNA

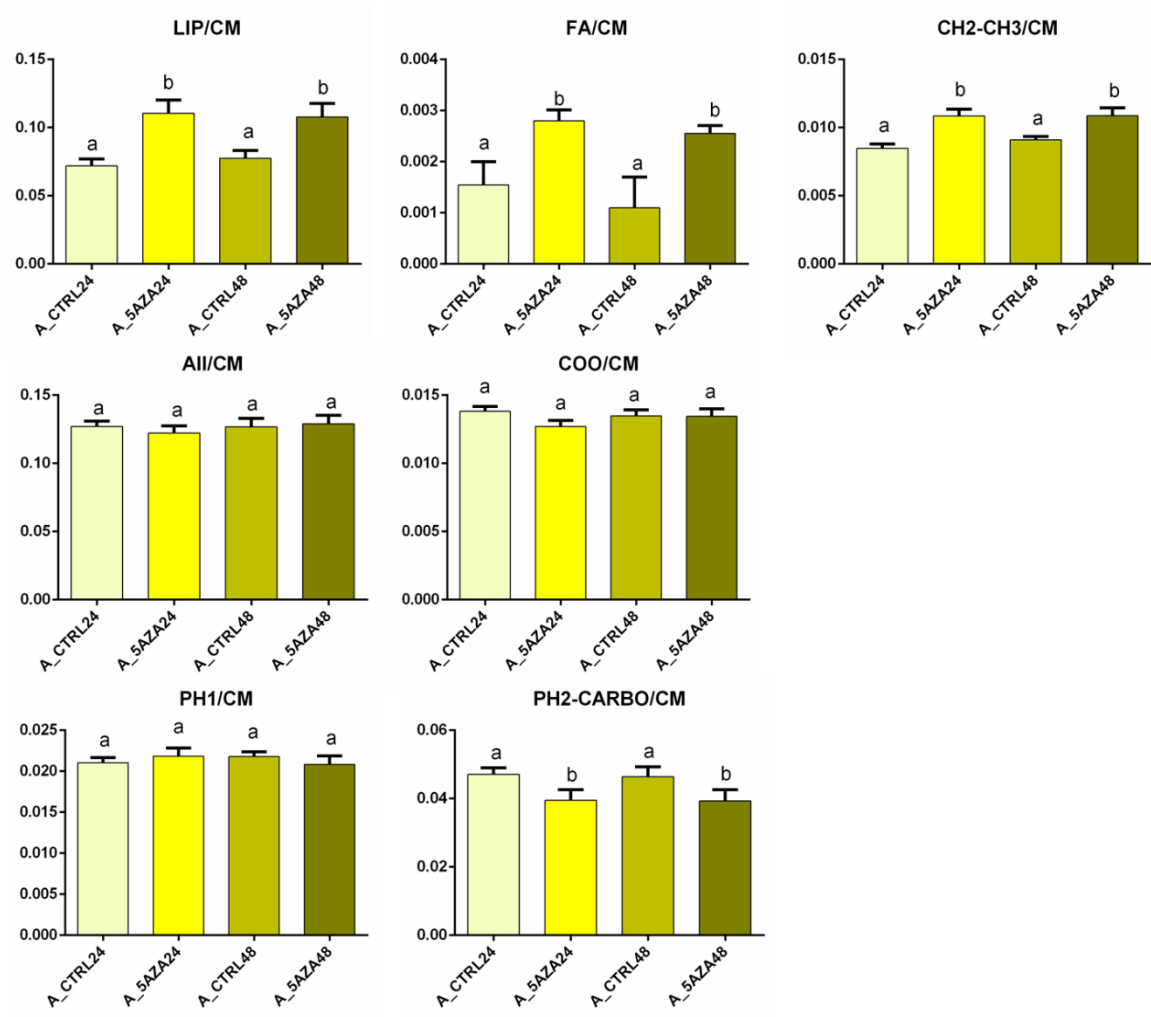
Da un primo confronto tra lo spettro medio delle cellule tumorali primarie di OSCC (A) e delle rispettive cellule staminali CSC (B), entrambe senza trattamento ed utilizzate, quindi, come controllo, è possibile notare alcune differenze a carico delle componenti lipidica e glucidica e dei composti fosforilati; non si evidenzino invece variazioni significative riguardo il contenuto di proteine e di acidi nucleici (Fig. 5.6). In particolare, si nota come nelle cellule staminali B ci sia una concentrazione maggiore di lipidi (LIP/CM, FA/CM e  $\text{CH}_2\text{-CH}_3/\text{CM}$ ), di composti fosforilati (COP/CM), mentre i gruppi fosfato ed i carboidrati (PH1/CM e PH2-CARBO/CM) sono presenti in minor quantità. Il contenuto di proteine (AII/CM e COO/CM) e DNA (DNA/CM), invece, non sembra variare.



**Figura 5.6.** Analisi statistica dei seguenti rapporti di banda, calcolati per i gruppi sperimentali A\_CTRL24 e B\_CTRL24: LIP/CM (contenuto totale di lipidi); FA/CM (contenuto di acidi grassi); CH2-CH3/CM (catene alchiliche dei lipidi); AII/CM (contenuto totale di proteine); COO/CM (aminoacidi); PH1/CM (contenuto di fosfati); COP/CM (composti fosforilati), PH2-CARBO/CM (contenuto di fosfati e carboidrati), DNA/CM (contenuto di DNA). CM è la somma delle aree degli intervalli spettrali 3000-2800 e 1750-900  $\text{cm}^{-1}$ , e viene considerata come rappresentativa del contenuto cellulare complessivo.

Successivamente, per ogni gruppo sperimentale, sono stati calcolati i seguenti rapporti di banda (Fig. 5. 7 e 5.8): **LIP/CM** (contenuto totale di lipidi); **FA/CM** (contenuto totale di acidi grassi) C=O; **AII/CM** (contenuto totale di proteine) AII; **CH2-CH3/CM** (catene alchiliche dei lipidi e delle proteine); **COO/CM** (aminoacidi); **PH1/CM** PH1 (contenuto di fosfati) e **PH2-CARBO/CM** PH2 (contenuto di fosfati e carboidrati).

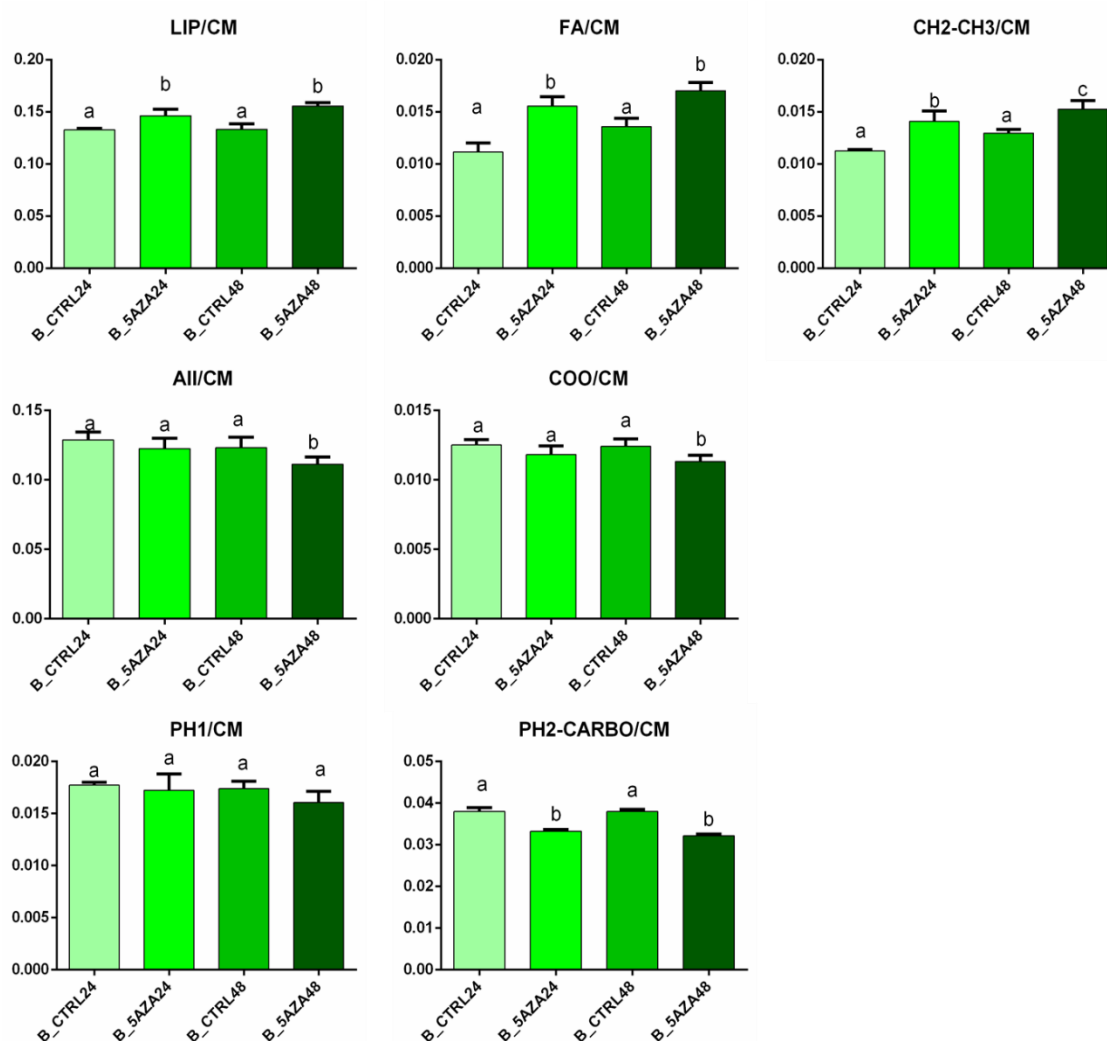
Per quanto riguarda il trattamento delle cellule tumorali OSCC di grado 3 (A) con 5-azacitidina a 24 e 48 ore, l'analisi statistica ha permesso di ricavare le seguenti informazioni: (i) un incremento statisticamente significativo ad entrambi i tempi della componente lipidica (rapporti LIP/CM e FA/CM) e della lunghezza delle catene alchiliche (rapporto CH2-CH3/CM); (ii) nessuna variazione statisticamente significativa nel contenuto proteico (rapporti AII/CM e COO/CM); (iii) nessuna variazione statisticamente significativa nel contenuto dei gruppi fosfato (rapporto PH1/CM) e una diminuzione statisticamente significativa dei carboidrati (rapporto PH2-CARBO/CM).



**Figura 5.7.** Analisi statistica dei seguenti rapporti di banda, calcolati per i gruppi sperimentali A\_CTRL24, A\_5AZA24, A\_CTRL48 e A\_5AZA48: LIP/CM (contenuto totale di lipidi); FA/CM (contenuto di acidi grassi); AII/CM (contenuto totale di proteine); CH2-CH3/CM (catene alchiliche dei lipidi); COO/CM (aminoacidi); PH1/CM (contenuto di fosfati), e PH2-CARBO/CM (contenuto di fosfati e carboidrati). CM è la somma delle aree degli intervalli spettrali 3000-2800 e 1750-900  $\text{cm}^{-1}$ , e viene considerata come rappresentativa del contenuto cellulare complessivo.

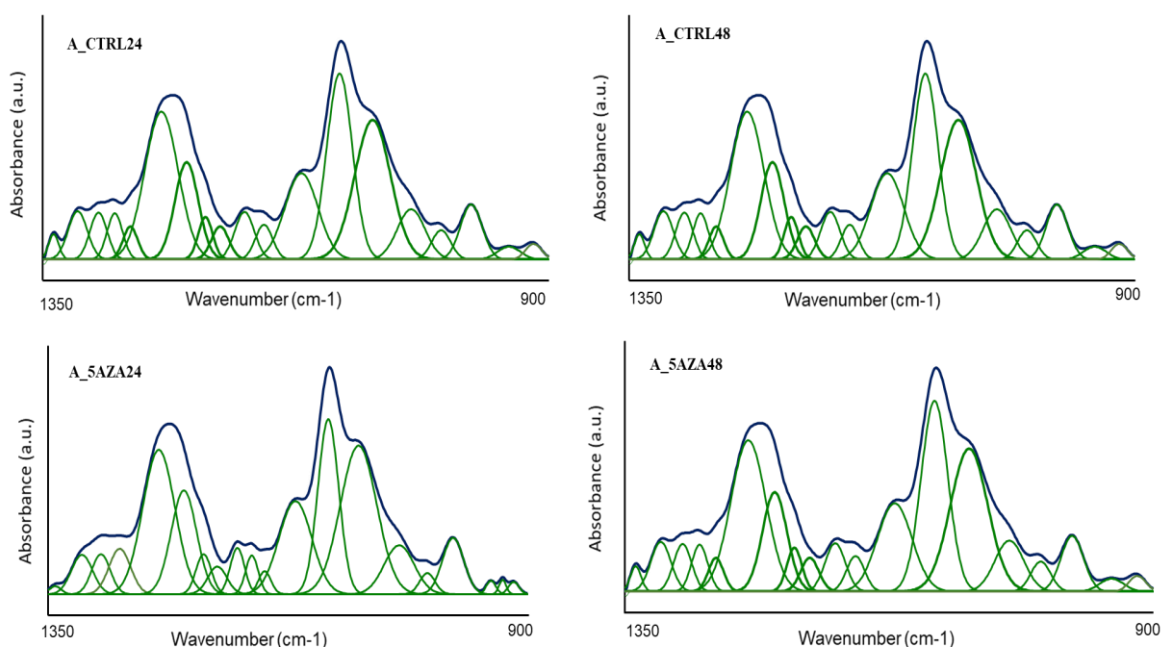
Per quanto riguarda il trattamento delle cellule staminali tumorali CSC (B) con 5-azacitidina a 24 e 48 ore, l'analisi statistica ha permesso di ricavare le seguenti informazioni: (i) un incremento statisticamente significativo ad entrambi i tempi della componente lipidica (rapporti LIP/CM e FA/CM) e delle catene alchiliche (rapporto CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>/CM); (ii) una diminuzione statisticamente significativa del contenuto proteico (rapporti AII/CM e COO/CM) solo a 48 ore di trattamento con 5-azacitidina; (iii) nessuna variazione statisticamente significativa nel contenuto dei gruppi fosfato (rapporto PH1/CM) e una diminuzione statisticamente significativa dei carboidrati (rapporto PH2-CARBO/CM).

Sulla base di questi risultati e in considerazione dell'attività ipometilante della 5-azacitidina, abbiamo preso in esame la regione spettrale 1350-900 cm<sup>-1</sup> relativa ai modi vibrazionali degli acidi nucleici, fosfati e carboidrati. Su tale intervallo spettrale sono state individuate tutte le bande componenti, tramite la procedura di Peak Fitting (Grams AI 9.1, Galactic Industries, Inc., Salem, New Hampshire).

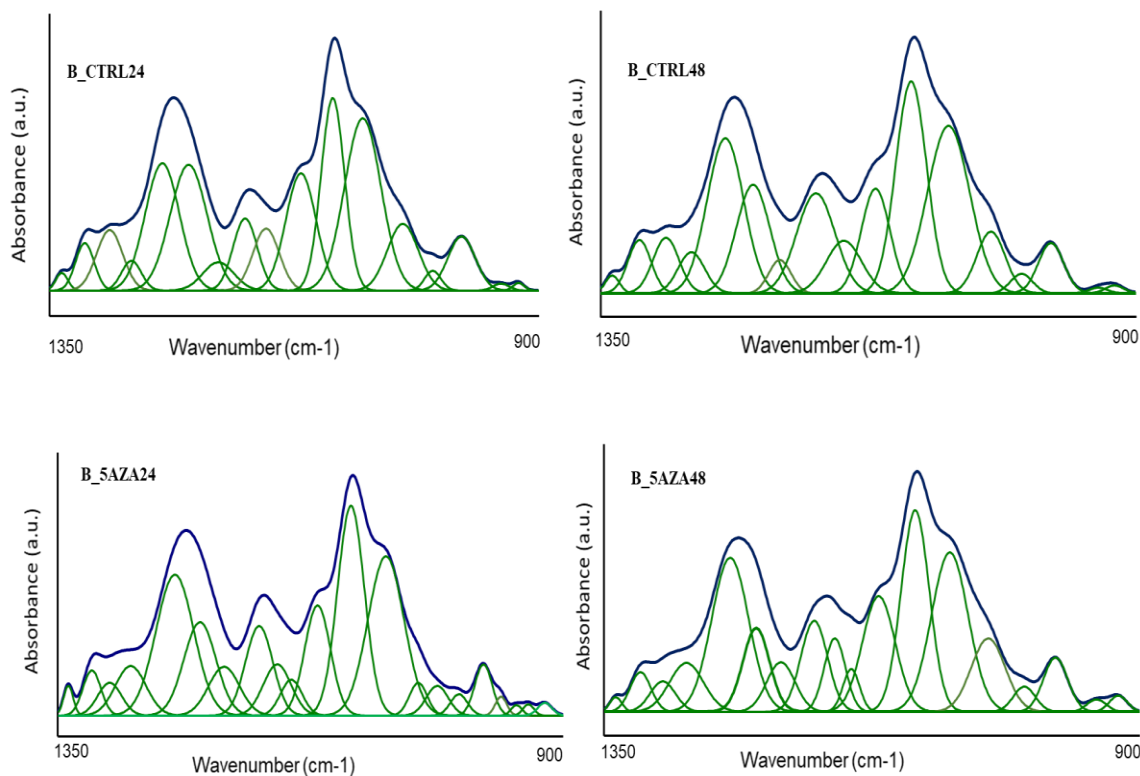


**Figura 5.8.** Analisi statistica dei seguenti rapporti di banda, calcolati per i gruppi sperimentali B\_CTRL24, B\_5AZA24, B\_CTRL48 e B\_5AZA48: LIP/CM (contenuto totale di lipidi); FA/CM (contenuto di acidi grassi); AII/CM (contenuto totale di proteine); CH2-CH3/CM (catene alchiliche dei lipidi); COO/CM (aminoacidi); PH1/CM (contenuto di fosfati), e PH2-CARBO/CM (contenuto di fosfati e carboidrati). CM è la somma delle aree degli intervalli spettrali 3000-2800 e 1750-900  $\text{cm}^{-1}$ , e viene considerata come rappresentativa del contenuto cellulare complessivo.

In tutti gli spettri sono state individuate le seguenti bande IR (Fig. 5.9 e 5.10): 1322 (ammide III, proteine), 1342 (collagene), 1244  $\text{cm}^{-1}$  e 1221  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$   $\text{PO}_2^-$ , gruppi fosfato di acidi nucleici e proteine fosforilate); 1171  $\text{cm}^{-1}$  e 1157  $\text{cm}^{-1}$  (legame C-O dei gruppi C-OP e C-OH di aminoacidi e carboidrati); 1086  $\text{cm}^{-1}$  (fosfati del DNA e RNA); 1058  $\text{cm}^{-1}$  (C-O degli acidi nucleici e degli oligosaccaridi); 1023  $\text{cm}^{-1}$  (legami C-O di glicogeno e carboidrati), 992  $\text{cm}^{-1}$  e 913  $\text{cm}^{-1}$  (RNA); 967  $\text{cm}^{-1}$  e 930  $\text{cm}^{-1}$  (DNA).



**Figura 5.9.** Peak fitting degli spettri medi calcolati per i gruppi sperimentali A\_CTRL24, A\_5AZA24, A\_CTRL48 e A\_5AZA48 nell'intervallo 1350-900  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 5.10.** Peak fitting degli spettri medi calcolati per i gruppi sperimentali B\_CTRL24, B\_5AZA24, B\_CTRL48 e B\_5AZA48 nell'intervallo 1350-900  $\text{cm}^{-1}$ .

Al fine di valutare l'effetto della 5-azacitidina sull'attività cellulare, sono stati analizzati i seguenti rapporti di banda per tutti i gruppi cellulari (A\_CTRL, A\_5AZA, B\_CTRL e B\_5AZA) in entrambi i tempi di trattamento (24 e 48 ore): 991/TOT e 913/TOT (*RNA*); 968/TOT, (*B-DNA*) 939/TOT (*Z-DNA*), 1058  $\text{cm}^{-1}$  (*acidi nucleici e oligosaccaridi*), 1086  $\text{cm}^{-1}$  (*fosfati degli acidi nucleici*); 1157/TOT (*C-OH di aminoacidi e carboidrati*); 1171/TOT (*C-OP di*

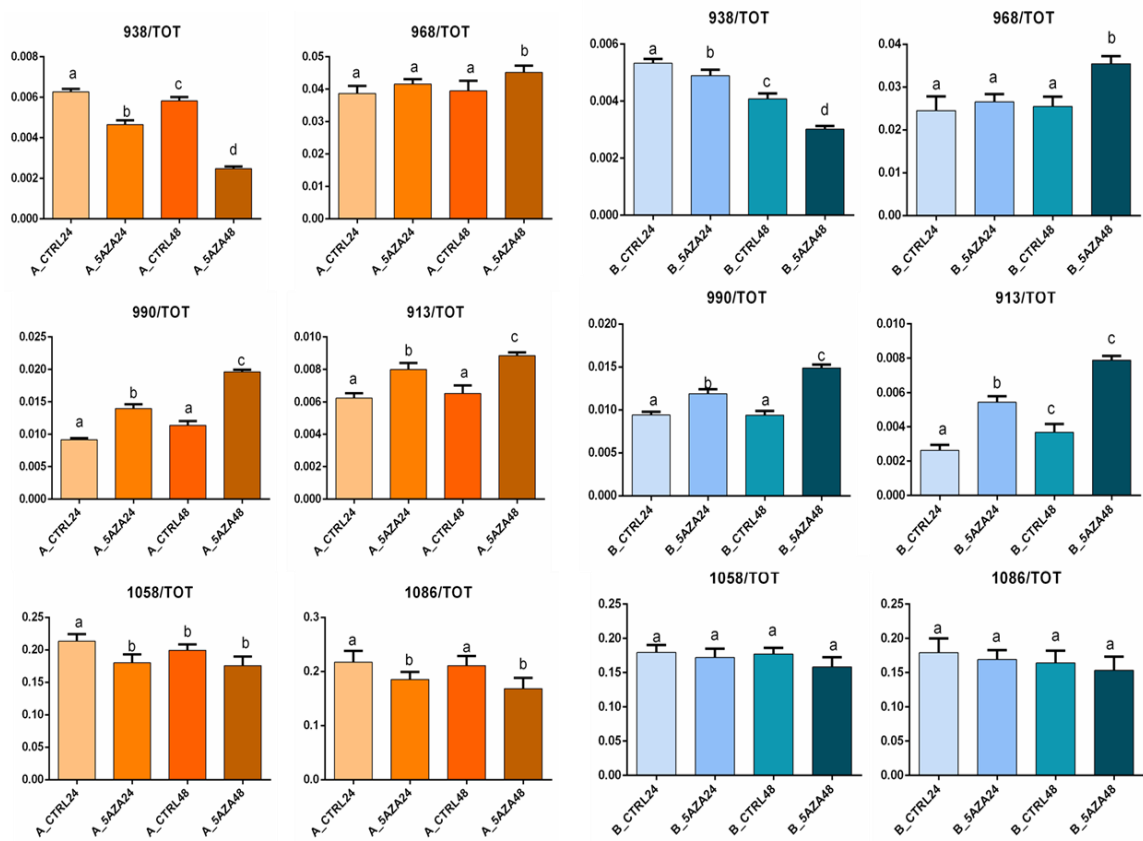


*aminoacidi e carboidrati*); 1221/TOT e 1247/TOT (*fosfati degli acidi nucleici*) (TOT corrisponde alla somma delle aree di tutte le bande contenute nell'intervallo spettrale 1350-900  $\text{cm}^{-1}$ ).

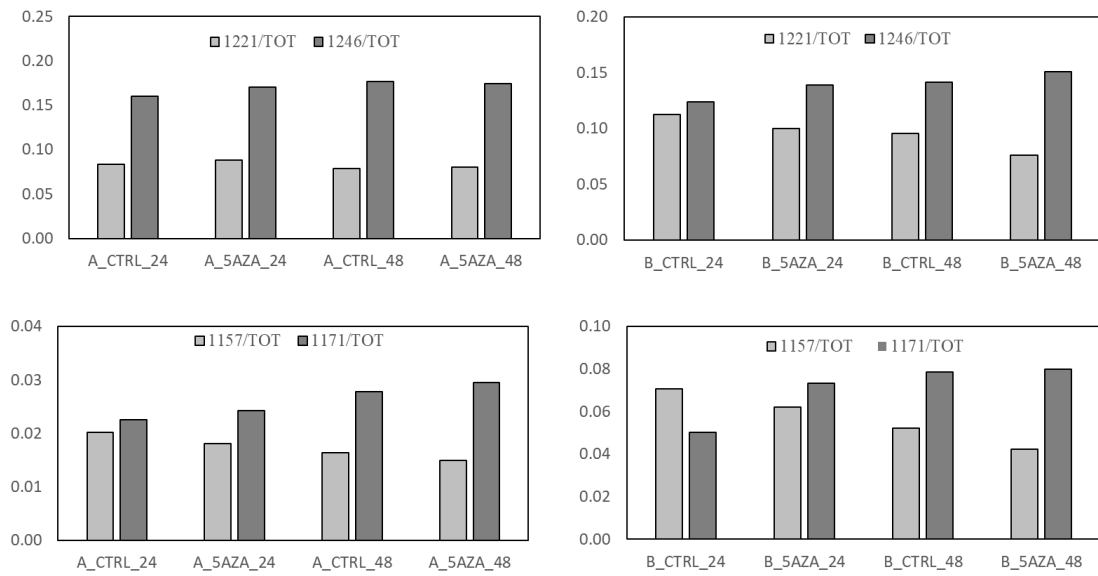
La Fig. 5.11 riporta i risultati ottenuti dall'analisi statistica per i rapporti di banda relativi agli acidi nucleici. Per quanto riguarda le cellule tumorali primarie di OSCC (A), si osserva: (i) una riduzione della forma metilata del DNA (rapporto 938/TOT), sia in seguito al trattamento con il chemioterapico, sia, considerando lo stesso campione cellulare, nel tempo (da 24 a 48 ore); (ii) un aumento della forma nativa del DNA (rapporto 968/TOT), conseguenza di (i); (iii) un incremento dell'attività trascrizionale, con un evidente aumento dell'RNA (rapporti 990/TOT e 913/TOT); (iv) una modesta riduzione, sia in seguito al trattamento, sia nei due tempi considerati (24 e 48 ore) dei gruppi fosfato degli acidi nucleici e i carboidrati (1058/TOT e 1086/TOT). Non si osserva invece alcuna variazione nella quantità di gruppi fosfato totali (1221/TOT e 1246/TOT), che risultano costanti sia in seguito al trattamento, sia alla durata dello stesso; in particolare, i gruppi fosfato coinvolti nel legame idrogeno e responsabili di una maggiore compattezza strutturale degli acidi nucleici (1221/TOT) sono sempre inferiori rispetto quelli non vincolati da legami intramolecolari (1246/TOT) (Fig. 5.12). Infine, si osserva un leggero aumento del processo di fosforilazione, considerato un marker spettrale delle

neoplasie del cavo orale, in corrispondenza degli amminoacidi e dei carboidrati (1157/TOT e 1171/TOT) (Fig. 5.12).

Per quanto riguarda le cellule staminali tumorali (B), gli andamenti spettrali sono analoghi a quelli riportati per le cellule tumorali primarie (A), in tutte le componenti cellulari, suggerendo, quindi, un effetto del farmaco confrontabile; l'unica differenza consiste in una riduzione più incisiva della componente glucidica (1058/TOT), sia in seguito al trattamento, sia in tutta la sua durata (da 24 a 48 ore) ed una riduzione più significativa dei gruppi C-OH degli amminoacidi e dei carboidrati a vantaggio della formazione dei gruppi C-OP.



**Figura 5.11.** Analisi statistica dei seguenti rapporti di banda calcolati mediante peak-fitting nell'intervallo  $1350-900\text{ cm}^{-1}$ , per i gruppi sperimentali A\_CTRL24, A\_5AZA24, A\_CTRL48, A\_5AZA48, B\_CTRL24, B\_5AZA24, B\_CTRL48 e B\_5AZA48: 938/TOT (Z-DNA); 968/TOT (B-DNA); 990/TOT (RNA); 913/TOT (RNA); 1058/TOT (carboidrati) e 1086/TOT (fosfati).



**Figura 5.12.** Analisi statistica dei seguenti rapporti di banda calcolati mediante peak-fitting nell'intervallo  $1350-900\text{ cm}^{-1}$ , per i gruppi sperimentali A\_CTRL24, A\_5AZA24, A\_CTRL48, A\_5AZA48, B\_CTRL24, B\_5AZA24, B\_CTRL48 e B\_5AZA48: 1221/TOT; 1246/TOT; 1157/TOT; 1171/TOT.

## Capitolo sesto

---

### CONCLUSIONI

Il carcinoma squamocellulare (Oral Squamous Cells Carcinoma, OSCC) rappresenta la lesione neoplastica più frequente nel cavo orale. Dati epidemiologici indicano tale tumore come l'ottantesimo più frequente nel mondo e responsabile del 3% dei decessi negli uomini e dell'1% dei decessi nelle donne. Inoltre, negli ultimi anni, è stato registrato un trend in continuo aumento nella sua incidenza, con un abbassamento dell'età media d'insorgenza ed un maggiore interessamento della popolazione femminile, i cui dati epidemiologici vanno progressivamente avvicinandosi a quelli della popolazione maschile.

Nonostante i progressi effettuati in campo sia chirurgico che terapeutico, la sopravvivenza media a 5 anni si mantiene ancora al di sotto del 50%. La principale causa di morte è rappresentata dalla comparsa di metastasi linfonodali la cui diffusione dipende da un piccolo numero di cellule staminali circoscritte in una zona ristretta del tumore chiamate cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*, CSC). Tali cellule sono altamente tumorigeniche,

in quanto mostrano meccanismi di resistenza endogena contro la radiazione e la chemioterapia molto più alti delle cellule tumorali già differenziate. La comprensione dei meccanismi biologici alla base del processo di metastatizzazione risulta quindi di cruciale importanza per individuare una terapia efficace contro tale patologia, in quanto mirata sulle cellule staminali tumorali.

In questo studio, la microspettroscopia FTIR è stata utilizzata per l'analisi *in vitro* di campioni di cellule tumorali primarie e staminali, ottenute da biopsie di carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC) e trattate con 5-azacitidina, un farmaco ipometilante, per 24 e 48 ore. Lo scopo della tesi è stato valutare gli effetti indotti da tale molecola sulle due tipologie di cellule (tumorali primarie e tumorali staminali) e stabilire le possibili differenze nella loro risposta all'attività chemioterapica della 5-azacitidina, utilizzata a dosaggi ridotti, tali da determinare solo l'effetto ipometilante e non quello citotossico. Ciò è stato effettuato mediante uno speciale dispositivo microfluidico, biocompatibile e trasparente alla radiazione infrarossa, che ha consentito di studiare le cellule tumorali direttamente nel loro ambiente di coltura.

La 5-Azacitidina è un analogo del nucleotide pirimidinico citidina, da cui differisce solamente per la presenza di un gruppo azotato in posizione 5 dell'anello eterociclico. Viene utilizzata come farmaco antitumorale, con

azione demetilante: agisce, infatti, in maniera specifica durante la fase S del ciclo cellulare, sostituendosi alla citidina nella replicazione del DNA, inibendo l'attività della DNA metiltransferasi (DNMT), bloccando la crescita cellulare ed inducendo, quindi, l'apoptosi.

Lo studio è stato condotto su due campioni sperimentali: le cellule tumorali primarie di OSCC di grado 3 (gruppo A) e le corrispondenti cellule staminali tumorali CSC (gruppo B).

Dall'analisi dei profili spettrali e di specifici rapporti di banda dei diversi gruppi sperimentali, è stato possibile ottenere numerose informazioni spettrali relative alla struttura macromolecolare (lipidi, proteine, acidi nucleici) e ai processi metabolici indotti dal trattamento delle cellule dei gruppi A e B con la 5-azacitidina. In particolare, il trattamento di entrambi i gruppi con il chemioterapico, a 24 e 48 ore, ha determinato: un incremento della componente lipidica e della lunghezza delle catene alchiliche, nessuna variazione nel contenuto proteico e nel contenuto dei gruppi fosfato (tranne che per le cellule del gruppo B, nelle quali si osserva una diminuzione del contenuto proteico solo a 48 ore di trattamento) ed una diminuzione dei carboidrati. Per valutare l'impatto della demetilazione sulle cellule tumorali primarie (A) e staminali (B), l'analisi spettrale e multivariata è stata ristretta alla regione spettrale 1350-900  $\text{cm}^{-1}$ , relativa agli acidi nucleici, ai gruppi fosfato ed ai carboidrati,

ottenendo i seguenti risultati:

(i) una riduzione della forma metilata del DNA, sia in seguito al trattamento con il chemioterapico, sia nel tempo (da 24 a 48 ore); (ii) un aumento della forma nativa del DNA e dell'attività trascrizionale, con un evidente aumento dell'RNA e (iii) una modesta riduzione, sia in seguito al trattamento, sia nei due tempi considerati, dei gruppi fosfato degli acidi nucleici e dei carboidrati. I gruppi fosfato totali, invece, risultano costanti sia in seguito al trattamento, sia alla durata dello stesso, pur mostrando una differenza di concentrazione tra i gruppi fosfato coinvolti nel legame idrogeno e quelli non vincolati da legami intramolecolari. Infine, si osserva un leggero aumento del processo di fosforilazione, considerato un marker spettrale delle neoplasie del cavo orale, in corrispondenza degli amminoacidi e dei carboidrati.

In conclusione, il seguente studio dimostra che la 5-azacitidina esercita un'attività ipometilante molto simile in entrambi i gruppi sperimentali, soprattutto in corrispondenza degli acidi nucleici. L'unica differenza che è stato possibile rilevare, infatti, è una riduzione della componente glucidica, nelle cellule del gruppo B, sia in seguito al trattamento, sia in tutta la sua durata ed una riduzione dei gruppi C-OH degli amminoacidi e dei carboidrati a vantaggio della formazione dei gruppi C-OP.



## ***Bibliografia***

---

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

Alò F., Conti C.,Ferrari P., Giorgini E., Rubini C., Sabbatini S., Tosi G. *Micro-FTIR imaging spectroscopy of calcified atheromatous carotid plaques.* Journal of Molecular Structure. 2009; 58-63.

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; 270-275.

Baillie R., Tan S.T., Itinteang T. *Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Review.*Front Oncol. 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.*V.S. 2014; 127-135.

Bradley A. *Carcinoma squamocellulare orofaringeo*. MD, Montefiore Medical Center, The University Hospital of Albert Einstein College of Medicine. Aprile 2018.

Byrne, H.J., Knife P., Keating M., Bonnierd F. *Spectral pre and post processing for Infrared and Raman spectroscopy of biological tissues and cells*. Chem. Soc. 2016; 1865-1878.

Collino A. *Alla ricerca di cellule staminali tumorali nei carcinomi orali*. 2017.

Conti C., Ferraris P., Giorgini E., Rubini C., Sabbatini S., Tosi G., Anastassopoulouc J., Arapantonid E., Arapantonid P., Boukakic E., Konstadoudakis S., Theophanides S., Valavanisd C. *FT-IR microimaging spectroscopy: A comparison between healthy and neoplastic human colon tissues*. Journal of Molecular Structure. 2008; 46-51.

Crupi V., De Domenico D., Interdonato S., Majolino D., Maisano G., Migliardo P., Venuti V. *FT-IR spectroscopy study on cutaneous neoplasie*. Journal of Molecular Structure. 2000; 563-564:115.

Da Silvia D.S., Hierl M., Mlynarek1 A., Kowalski L.P., Moulay A. Alaoui-Jamali. *Recurrent oral cancer: current and emerging therapeutic approache*. Front Pharmacol. 2012; 3:149.

Diem M., Romeo M., Matthaus C., Miljkovic M., Miller L., Lasch P. *Comparison of Fourier transform infrared (FTIR)spectra of individual cells acquired using synchrotron andconventional sources*. Infrared Phys. Technol. 2004; 45, 331–338.

Döbrossy L. *Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem*. Cancer Metastasis Rev. 2005; 24(1):9-17.

Ferreira F., Nedel F., EtgesII A., Neutzling Gomes A.P., Furuse C., 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; 0103-6440.

Gazi E., Dwyer j., Lockyer N., Gadner P., Vickerman J.C., Miyan J.,Hart C.A., Brown M., Shanks J.h., Clarke N. *A Correlation of FTIR Spectra Derived from Prostate Cancer Biopsies with Gleason Grade and Tumour*. European Urology. 2006; 750-761.

Giorgini E., Sabbatini S., Conti C., Rubini C., Rocchetti R., Re M, Vaccari L., Mitri E., Librando V. *Vibrational mapping of sinonasal lesions by Fourier transform infrared imaging spectroscopy* . Journal of Biomedical Optics . 2015; 10.1117/1.

Giorgini E. , Conti C., Rocchetti R., Rubini C., Sabbatini S., Librando V., Tosi G. *Study of oral cavity lesions by infrared spectroscopy*. J Biol Regul Homeost Agents. 2016; 30(1):309-14.

Giorgini E.,Sabbatini S., Rocchetti R., Notarstefno V.*In vitro FTIR microspectroscopy analysis of primary Oral Squamous Carcinoma cells treated with cisplatin and 5-fluorouracil: a new spectroscopic approach for studying drug-cell interaction.* The Analyst .2018; 10.1039/C8AN00602D.

Green F.G., Page D.L., Fleming I.D., Fritz A., Balch C.M.,Haller D.G.. *AJCC cancer staging manual\_sixth edition.* Morrow.MLip and Oral Cavity. 2002; 23-32.

Jackson M.,Mantsch H.H. *The medical challenge to infrared spectroscopy.* Journal of Molecular Structure. 1997; 408–409.

Jamin N., Dumas P., Moncuit .J, Fridman W.H., Teillaud J.L., Carr G.L., Williams G.P. *Chemical imaging of nucleic acids, proteins and lipids of a single living cell. Application of synchrotron infrared microspectrometry in cell biology.* Cell Mol Biol .1998; 44(1):9-13.

Jordan C.T, Guzman M.L. *Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells.*Oncogene. 2004; 23(43):7178-87.

Jordan C., Guzman M.L., Noble M. *Cancer stem cells.* N .Engl J.Med. 2006 ; 355(12):1253-61.

Johnson V., Keith R.Martin. *Stem Cells: A Future Glaucoma Therapy?* Glaucoma (Second Edition) 2015; 642-656.

Kneipp J., Lash P., Baldauf E., Beekes M., Naumann D. *Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy.* *Biochim biophys Acta.* 2000; 1501(2\_3):189-99.

Kuykendall J.R. *5-azacytidine and decitabine monotherapies of myelodysplastic disorders.* *Ann Pharmacother.* 2005; 39(10):1700-9.

Liu K.Z., Shultz C.P., Salomon E.A. Man A., Mantsh H.H. *Infrared spectroscopic diagnosis of thyroid tumors.* *Journal of Molecular Structure.* 2003; 397-404.

Mantsch H.H., Choo-Smith L.P., R.anthony Shaw R.A. *Vibrational Spectroscopy and Medicine.* *Vibrational Spectroscopy.* 2002; 30:31.

Mantsch H.H., McElhaney R.N. *Applications of infrared spectroscopy to biology and Müller A., Florek M. 5-Azacytidine/Azacitidine. Recent Results Cancer Res* 2010; 184:159-70 *medicine. Journal of Molecular Structure.* 1990; 347-362.

Matuschita M., Kawaguchi M. *Immunomodulatory Effect of drugs for effective cancer immunotherapy.* *J.Oncol.* 2018; 8653489.

Müller A., Florek M. *5-Azacytidine/Azacitidine. Recent results cancer.* 2010; 184:159-70.

Naumann D., Fijala V., Labischinski H. *The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis. Microchimica Acta.* 1988; 373–377.

Patterson A.D., Gonzalez F.J., Perdew G.H., Peters J.M. *Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe.* Toxicol Sci. 2018; 165(2):277-283.

Prieto-Vila M., Takahashi R., Usuba W., Kohama I., Ochiya T. *Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cell and Their Niche.* International Journal of Molecular Scienze. 2017; 18,1-22.

Ranui B., Swee T., Tinte I. *Cancer Stem Cells in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma.* A Review. Front Oncol. 2017; 7: 112

Russo G., La Spina M., Samperi P., Lo Nigro L. *Farmaci che modulano l'espressione del dna: attuali e potenziali applicazioni in pediatria.* Prospettive in pediatria. 2014; 44,240-245.

Rygiel K., Bulas L. *Epigenetic therapies in patients with solid tumors: Focus on monotherapy with deoxyribonucleic acid methyltransferase inhibitors and histone deacetylase inhibitors*. Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2019; 961-970.

Sagar J., Boussad C., Kevin S., Marc W., Alexander S. *Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review*. Cancer Cell Int. 2007; 7: 9.

Sato T., Jssa J.J., Krop P. *DNA Hypomethylating Drugs in Cancer Therapy* Cold Spring Harb Perspect Med. 2017; 7(5): a026948.

Shaw R.A., Mansfield J.R., Rempel S.P., Low-Ying S., Kupriyanov V., Mantsch H.H. *Analysis of biomedical spectra and images: from data to diagnosis* Journal of Molecular Structure. THEOCHEM. 2000; 00:129.

Steinbichler T.B., Dudás J., Skvortsov S., Ganswindt U., Riechelmann H., Skvortsova II. *Therapy resistance mediated by cancer stem cells*. Semin Cancer Biol. 2018; 53:156-167.

Stuart B. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. John Wiley & Sons. 1997.

Sulè -Suso j. Skingsley D., Sockalingum G.D., Kohler A., Kegelaer G., Manfait M., El Hai A.J. *FT-IR microspectroscopy as a tool to assess lung cancer cells response to chemotherapy*. Vibrational Spectroscopy. 2005; 179-184.

Tiffon C., Adams J., Van der Fits L., Wen S., Townsend .P, Ganesan A., Hodges E., Vermeer M., Packham G. *The histone deacetylase inhibitors vorinostat and romidepsin downmodulate IL-10 expression in cutaneous T-cell lymphoma cells.* Br J Pharmacol. 2011; 162(7):1590-602.

Vaccaro E. *Leucemia mieloide acuta, con azacitidina migliora la sopravvivenza.* Il giornale sui farmaci. 2014.

Vargas-Ferreira F., Nedel F. Etges A.,Gomes A.P.,Furuse C.,Tarquinio S.B. *Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach.* Braz Dent J. 2012; (5):586-90

Wang J.S., Shi J.S., Zu.Y.Z., Duan X.Y., Zhang L.,Yang L.M.,Weng S.F.,Wu J.G.,World J. *FT-IR spectroscopic analysis of normal and cancerous tissues of esophagus.*World J Gastroenterol.2003; 9(9) : 1897\_1899

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



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 Lett.* 2007; 246(1-2):1-11.

## *Ringraziamenti*

---