

Alma Mater Studiorum – Università degli studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Farmacologiche e Tossicologiche,
dello Sviluppo e del Movimento Umano

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/H2-ISTOLOGIA

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/17-ISTOLOGIA

“Caratterizzazione di cellule staminali cancerose
dei tumori del colon-retto e loro risposta al
trattamento con estratti di piante medicamentose”

Presentata da: Iapichino Anastasia

Coordinatore Dottorato:

Prof.ssa Hrelia Patrizia

Supervisore:

Dott.ssa Martinelli Marcella

Esame finale anno 2019

ABSTRACT

Il **cancro del colon-retto** è una delle neoplasie più frequenti, ad alto tasso di mortalità, causato dall'interazione di fattori genetici e ambientali. Parallelamente al modello stocastico, secondo il quale tutte le cellule tumorali (CT) hanno una stessa, seppur bassa, probabilità di rigenerare un tumore, sta sempre più prendendo piede il modello che vede solamente in un piccolissimo sottogruppo di cellule staminali tumorali (CST) la capacità di dar luogo e sostenere la crescita tumorale.

Dalla letteratura si evince come le CST mostrino importanti deregolazioni a carico di geni implicati in: chemio-resistenza, transizione epitelio-mesenchimale (EMT), auto-rinnovamento incontrollato, processi peculiari di questa piccola sottopopolazione, che favoriscono l'insorgenza di un fenotipo tumorale.

Lo **scopo** del mio progetto di Dottorato è stato quello di isolare e caratterizzare le CST sia da linee cellulari tumorali che da biopsie di tumore al colon-retto, al fine di identificare marcatori tumorali utili a delineare le fasi di progressione del tumore e di individuare potenziali bersagli terapeutici.

Inoltre, ho sottoposto le CT e le CST di una linea di adenocarcinoma del colon-retto (HCA7), a trattamento con l'estratto naturale di *T. cordifolia*, pianta utilizzata della medicina Ayurvedica, ed uno dei suoi principi attivi, la berberina, allo scopo di verificarne l'efficacia antitumorale.

Ho osservato importanti deregolazioni nelle popolazioni cellulari trattate, a carico di diversi geni coinvolti principalmente nella **EMT** (TSPAN13, CAMK2, ITAG5, SNAI2), nella regolazione del **ciclo cellulare** e della **apoptosi** (CCNA2, CCNB1, CCNB2, ANAPC2, BAX, BCL2, BCLXL) e nel favorire un **fenotipo chemio-resistente** (ABCC1, ABCC2, ABCB1). I livelli di espressione di questi geni sono risultati essere significativamente sotto-espressi, sia nelle CT trattate che nelle CST trattate. I risultati che ho ottenuto depongono a favore di un potenziale ruolo attivo della sostanza naturale sottoposta ad indagine, nel contrastare molti di quei processi fondamentali per lo sviluppo di un fenotipo tumorale. Inoltre, i miei dati avvallano anche l'ipotesi che vede le CST come potenziali bersagli terapeutici, ai fini di ottenere un effetto mirato su questa popolazione cellulare tumorale.

1. INTRODUZIONE

CARCINOMA COLO-RETTALE

Il carcinoma al colon-retto (CCR) è una delle neoplasie più frequenti in Italia con una incidenza di circa 53.000 nuove diagnosi annue ed occupa il secondo posto per mortalità tumorale sia nell'uomo che nella donna, successivo a quello della prostata e della mammella, rispettivamente (dati 2017 Associazione Italiana Registro Tumori, AIRTUM).

L'incidenza e la mortalità registrate per questa neoplasia sono maggiori nell'uomo rispetto alla donna, in una età compresa tra i 55 e gli 80 anni.

Con carcinoma colo-rettale si indica qualsiasi neoplasia avente sede tra l'inizio del cieco ed il retto. Tuttavia, le sedi maggiormente colpite sono il retto (40%) ed il sigma (25%), anche se a rischio è tutto l'intestino crasso (<https://www.iao.it/it/PER-I-PAZIENTI/Cure/Tumori-dellintestino/>) (Fig.1).

La diagnosi di tale patologia risulta di fondamentale importanza, in quanto aumenta significativamente la prospettiva di sopravvivenza quanto più precocemente. Da i "I numeri del cancro in Italia 2017" emergono dei dati incoraggianti: le probabilità di guarigione sono più elevate se il tumore viene diagnosticato nelle fasi iniziali della patologia, con una prospettiva di sopravvivenza a 5 anni di circa il 63% nelle donne e il 54% negli uomini; ma tale prospettiva diminuisce al 15-20% se la diagnosi viene effettuata nelle fasi tardive (dati 2017 AIRTUM e AIOM).

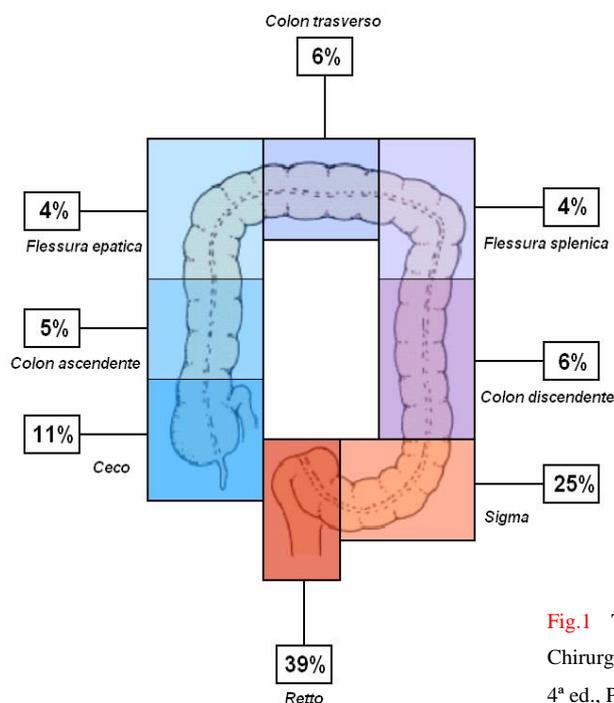


Fig.1 Tratto da: Dionigi, Basi teoriche e Chirurgia generale - Chirurgia specialistica, 4ª ed., Padova, Elsevier Masson, 2006,

Cause e fattori di rischio

Molte sono le cause che concorrono nel determinare la malattia e possono essere sia di natura estrinseca che intrinseca.

Le cause di natura estrinseca sono dovute a fattori di rischio che possono essere modificati e corretti quali:

- alimentazione, dove è risaputo che una dieta ricca di fibre, frutta, vegetali, calcio, vitamina D e povera di grassi e proteine animali potrebbe diminuire la probabilità di insorgenza del tumore;
- fumo e alcool;
- obesità;
- corredo ormonale, ma su questo punto ci sono dati discordanti e dunque incerti;
- sedentarietà;

Invece, le cause di natura intrinseca sono dovute a quei fattori di rischio che non sono modificabili, come ad esempio:

- età, per la quale si ha un rischio maggiore dopo i 50 anni con un picco di massima incidenza intorno agli 80 anni;
- genere, anche se negli ultimi anni l'incidenza per maschi e femmine si sta uniformando, a differenza degli anni precedenti in cui erano gli uomini ad essere maggiormente colpiti;
- presenza di patologie infiammatorie croniche dell'intestino, quali morbo di Crohn e retto-colite ulcerosa, che causano un ulteriore danneggiamento della mucosa intestinale;
- presenza di lesioni precancerose, quali polipi adenomatosi e/o villosi che possono aumentare la probabilità di insorgenza del tumore;
- familiarità;
- fattori genetici, in quanto le cellule di questo tipo di cancro presentano mutazioni ereditate o acquisite a carico di geni che sono coinvolti in diverse vie di trasduzione del segnale implicate in sviluppo e differenziamento (ad es via del Wnt/ β -catenina, Notch) e/o nella replicazione o riparazione del DNA [1-3]. Questo aspetto merita un approfondimento.

✓ *La genetica*

Il tumore al colon-retto è una malattia caratterizzata dall'interazione di fattori ambientali e fattori genetici. La maggior parte dei casi è di natura sporadica, mentre una piccola parte è rappresentata da forme ereditarie.

I carcinomi sporadici rappresentano circa l'80%, non sono associati a forme familiari (15-20%) o a sindromi ereditarie (2-5%) e si manifestano senza che ci sia una predisposizione genetica preesistente. Essi sono dovuti ad alterazioni del DNA sia genetiche che epigenetiche [4], che causano de-regolazione nell'omeostasi tissutale provocando così una trasformazione delle cellule normali dell'epitelio intestinale in cellule cancerose (Fig.2). Le de-regolazioni avvengono principalmente a carico di proto-oncogeni¹ e/o oncosoppressori².

La maggior parte delle alterazioni geniche si trovano a livello di un gene oncosoppressore localizzato sul cromosoma 5 in q21-22 e che codifica per la proteina **Adenomatous Polyposis Coli (APC)**. In condizioni fisiologiche, la proteina APC favorisce la migrazione e l'adesione cellulare e prende parte alla via di trasduzione del segnale Wnt/ β -catenina. APC è presente sia a livello citoplasmatico che nucleare e funge da proteina *shuttle* in grado di muoversi facilmente tra il citosol e il nucleo. Infatti, essa è in grado di attraversare la membrana nucleare grazie alla presenza domini proteici coinvolti nei segnali di localizzazione cellulare [5]. Il ruolo principale di APC è quello di modulare i livelli citoplasmatici di **β -catenina**: quando la proteina APC si trova localizzata nel citosol è in grado di legare, attraverso domini proteici specifici, l'axina, la β -catenina e la GSK-3B. Il complesso enzimatico APC/axina/GSK-3B va a fosforilare la β -catenina, che a sua volta viene ubiquitinata e di conseguenza destinata al segnale di degradazione da parte dei proteosomi [6]; per contro, quando è presente il fattore Wnt e si lega al suo recettore di membrana *Frizzled*, si scatena una serie di eventi intracellulari che portano ad una inattivazione della proteina APC, la quale non riesce ad interagire con la β -catenina e si ha conseguente accumulo di questa ultima nel citosol. Successivamente, la β -catenina riesce a traslocare nel nucleo e va a legarsi a fattori trascrizionali, come TCF/LEF e attivare la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (cMyc e ciclinaD) [7,8].

¹**Oncogene**: gene che codifica per una proteina coinvolta nello sviluppo di un fenotipo tumorale, favorendo proliferazione cellulare, differenziamento e sopravvivenza. Un oncogene può derivare o da alterazione di un gene normale oppure da un proto-oncogene, ossia un gene che codifica per proteine coinvolte nella via di trasduzione del segnale, attraverso le quali i segnali di crescita o di non crescita sono trasferiti dall'esterno della cellula al macchinario regolativo presente all'interno di essa (Enciclopedia TRECCANI).

²**Oncosoppressore**: gene che codifica per una proteina che regola negativamente la proliferazione cellulare (Enciclopedia TRECCANI).

Dunque, alterazioni nel gene APC causano disequilibri nella funzionalità del complesso multiproteico APC-axina-GSK3B che provocano una attivazione costitutiva del pathway di Wnt e di conseguenza inducono lo sviluppo di un fenotipo tumorale.

La β -catenina è anche un componente essenziale del complesso di adesione cellulare della **E-caderina** [9,10], una delle principali proteine coinvolte nelle adesioni cellula-cellula [11], che sono di fondamentale importanza nella formazione e mantenimento dei tessuti epiteliali, tra cui anche quello intestinale [12]. L'E-caderina risulta down-regolata in molte neoplasie, tra cui anche quella al colon-retto, in cui le cellule evadono dai normali segnali di crescita e vanno incontro ad una proliferazione incontrollata e ad una perdita di differenziamento, caratteristiche tipiche del fenotipo tumorale [12,13].

APC si trova mutata nel 70-80% dei casi sporadici di carcinoma colo-rettale (CCR) e circa il 50% mostra mutazioni anche a carico della β -catenina [6,14,15].

Un'altra importante alterazione genica è quella a carico dell'oncogene K-RAS in circa il 40% dei casi con tumori al colon-retto [16-20].

Il **gene K-RAS** è localizzato sul cromosoma 12 e codifica per una proteina che fa parte della super famiglia delle proteine RAS con attività GTP-asi [21]. La proteina K-RAS è una proteina di membrana che, se attivata, scatena una serie di eventi intracellulari che portano alla trascrizione di geni che codificano per proteine coinvolte nella proliferazione cellulare [22]. Altre mutazioni importanti sono state trovate a carico di geni quali TP53, SMAD2 e 4, PTEN, PIK3CA, TGF β RII [23-31].

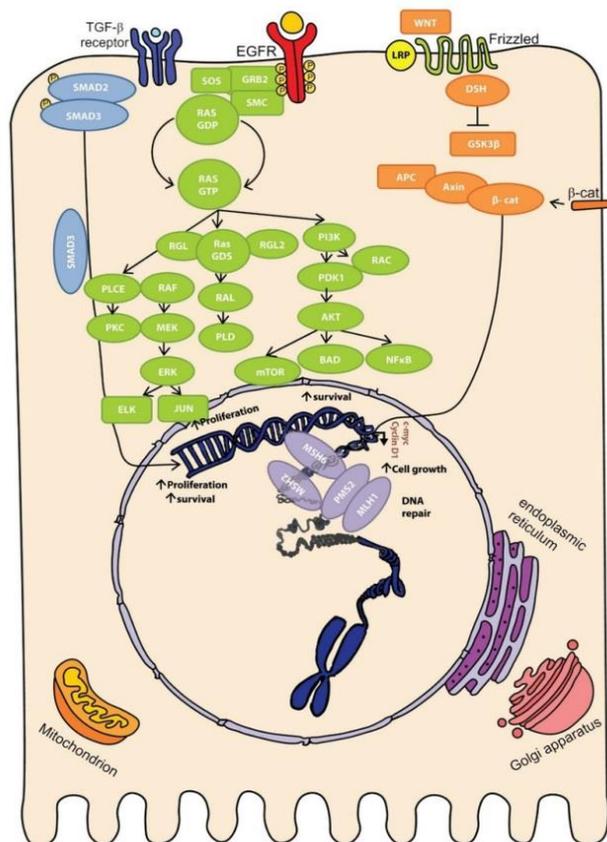


Fig.2 Patway molecolari principali coinvolti nello sviluppo del tumore al colon-retto.

(Mármol I, Sánchez-de-Diego C. *et. al.* Int J Mol Sci. 2017)

Le forme ereditarie di questa tipologia di neoplasia sono in una percentuale bassa (circa 2-5%) e sono dovute ad anomalie genetiche che vengono trasmesse dai genitori, tra cui troviamo *Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP)*, *cancro del colon ereditario non poliposico (HNPCC)* o *Sindrome di Lynch*, *Poliposi Ereditaria*, *Poliposi MYH-associata (MAP)* [32].

Patogenesi

Il tumore al colon-retto è il risultato di una proliferazione incontrollata delle cellule che rivestono la mucosa di questo organo.

Il colon ed il retto fanno parte dell'intestino crasso, insieme al cieco ed al sigma. La principale funzione fisiologica dell'intestino crasso è il riassorbimento di acqua e sali minerali dal residuo liquido proveniente dall'intestino tenue e la successiva propulsione delle feci verso il retto.

La parete di questo organo, come si evince dalla Fig.3, è formata da diversi strati e dall'interno verso l'esterno troviamo:

- ✓ tonaca mucosa, strato di rivestimento a contatto con il lume;
- ✓ tonaca sottomucosa, che contiene il plesso nervoso di Meissner;
- ✓ tonaca muscolare, con fasci muscolari per permettere i movimenti intestinali (peristalsi);
- ✓ tonaca sierosa, strato più esterno che fissa l'organo alla parete addominale.

La **tonaca mucosa**, a sua volta, è suddivisa in tre strati: a) *epitelio di rivestimento*, rivolto verso il lume dell'organo e formato da un epitelio cilindrico semplice che, in corrispondenza della base dei villi intestinali, presenta le cripte di Lieberkuhn, ricche di cellule staminali; b) *lamina propria*, nella quale si trovano ghiandole e noduli linfatici e che ha funzione di sostegno dell'epitelio intestinale; 3) la *muscularis mucosae*, con fasci muscolari interni circolari e fasci esterni longitudinali, che permette un movimento proprio della tonaca mucosa.

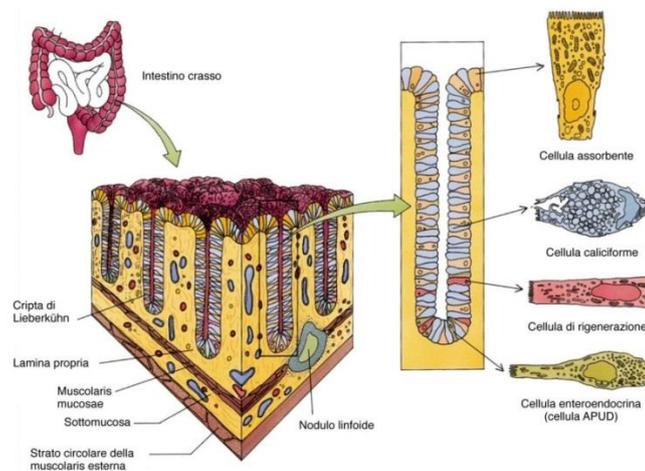


Fig.3 http://people.unipmn.it/pons/index_file/imm%20app%20digerente/intest%20crasso.jpg

Il carcinoma del colon-retto si sviluppa nella maggior parte dei casi da una lesione benigna pre-esistente, chiamata polipo adenomatoso, per poi evolvere in lesione maligna in grado di metastatizzare, definita adenocarcinoma.

La lesione benigna si presenta come una protrusione della tonaca mucosa ed infatti è formata dalle stesse popolazioni cellulari di questa ultima che prolifera in maniera incontrollata.

La lesione diventa maligna nel momento in cui il tumore riesce ad invadere gli altri strati sottostanti, quali t. sottomucosa, t. muscolare, t. sierosa, ed anche organi vicini.

Da qui, può metastatizzare, quando cioè le cellule del tumore invadano organi lontani dalla sede primaria.

Il CCR è un classico esempio di patologia multistep [33]: sono necessari danni genetici multipli affinché l'epitelio intestinale normale si trasformi in epitelio neoplastico.

I geni coinvolti nella carcinogenesi sono principalmente:

- oncogeni,
- oncosoppressori,
- geni implicati nella riparazione del DNA, con conseguente accumulo di mutazioni

Le mutazioni genetiche responsabili del cancro del colon-retto in forma sporadica sono le stesse che caratterizzano le forme ereditarie [1].

A livello genetico-molecolare esistono due modelli diversi che spiegano le modalità attraverso cui il CCR riesce a svilupparsi. Il primo si ha in circa il 75-85% dei casi [34] e progredisce secondo un modello definito **“adenoma-carcinoma”**, il quale parte da una origine adenomatosa (piccola escrescenza della mucosa), per poi evolvere a carcinoma vero e proprio in seguito ad accumulo di successive mutazioni genetiche. Questo modello porta infatti ad una instabilità genetica, caratterizzata da delezioni alleliche e cromosomiche, aneuploidia, attivazioni di oncogeni ed inattivazioni di importanti oncosoppressori.

La sequenza adenoma-carcinoma inizia con l'inattivazione della proteina APC [35] che scatena una iper-proliferazione dell'epitelio intestinale e perdita del segnale di contatto intercellulare. Successivamente, l'epitelio continua a proliferare in maniera incontrollata a causa di mutazioni attivanti sull'oncogene KRAS [36,37] con conseguente formazione di piccoli adenomi a displasia³ lieve. In seguito, alterazioni geniche a carico di oncosoppressori come TP53 [38] e SMAD2-4 [39,40] portano a displasia grave con conseguente formazione di voluminosi adenomi, finché ulteriori mutazioni a carico di geni coinvolti nel ciclo cellulare e/o riparazione dei danni al DNA, causano la formazione del carcinoma vero e proprio, che può eventualmente evolvere in invasivo e quindi metastatizzare [34,41,42] (Fig.4).

³ **Displasia:** Proliferazione cellulare disordinata, principalmente a carico dei tessuti epiteliali (Enciclopedia TRECCANI).

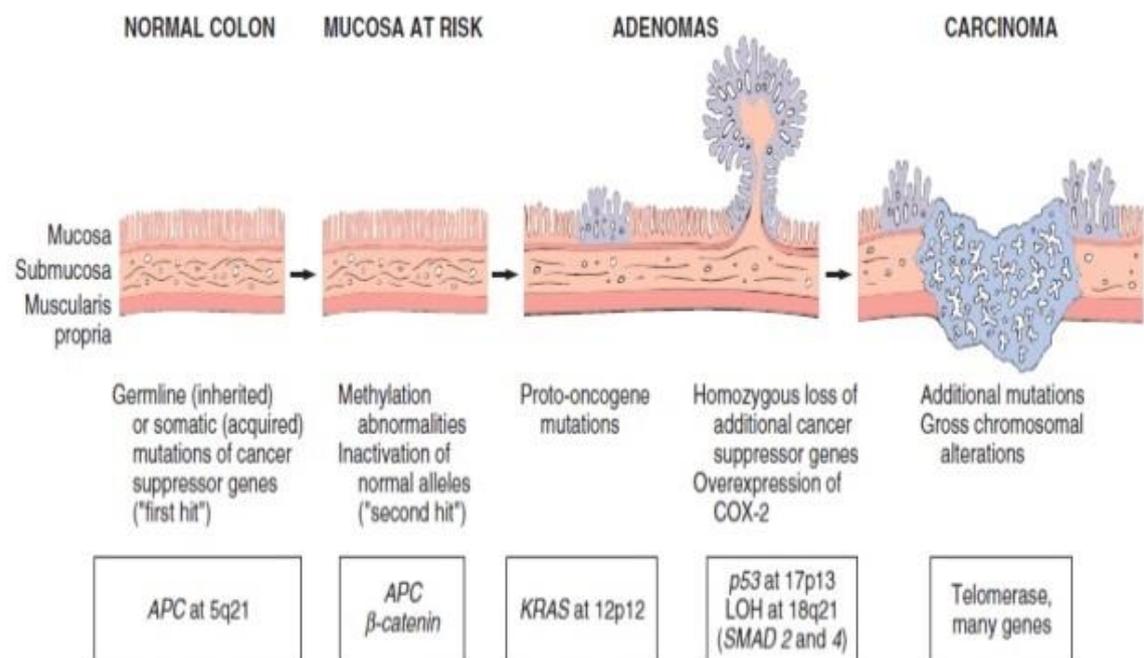


Fig.4 Sequenza adenoma-carcinoma nel tumore del colon retto. L'alterazione genica distintiva di questa neoplasia è responsabile dei cambiamenti nella struttura morfologica della mucosa intestinale ("Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 9th edition", Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C., 2015)

Il secondo modello è caratterizzato invece da instabilità nei microsatelliti che, in condizioni fisiologiche, sono importanti per la modulazione dei processi di induzione o arresto della trascrizione. Questo modello è presente nella maggior parte dei casi di cancro ereditario non poliposico (HNPCC o sindrome di Lynch) ed in circa il 15% dei carcinomi sporadici. I cromosomi risultano integri, ma la mutazione avviene a livello del *mismatch repair system* [43].

Potenziati trattamenti

La **resezione chirurgica** rappresenta il trattamento d'elezione dei tumori del colon-retto localizzati, in quanto circa l'80% dei pazienti si presenta alla diagnosi con malattia resecabile radicalmente. Tuttavia, il 30-40% dei casi sviluppa una recidiva a distanza di 2-3 o, comunque, entro i primi 5 anni dall'intervento [44-46]. Un ulteriore trattamento è rappresentato dalla somministrazione di **chemio-terapici**⁴ prima o dopo intervento chirurgico.

La chemio-terapia pre-intervento è definita neo-adiuvante in quanto ha la funzione di ridurre o eliminare la massa tumorale.

⁴ **Chemio-terapico:** Sostanza di sintesi ad azione citotossica o antiblastica selettiva nei confronti di determinati agenti morbosi, di tipo infettivo oppure tumorale (Enciclopedia TRECCANI).

Essa spesso può essere associata a **radio-terapia** per aumentare la probabilità di guarigione [47]. I principali farmaci utilizzati in questa tipologia di trattamento sono la *capecitabina* o *fluoropirimidina* [48].

La chemio-terapia effettuata post-intervento, invece, è definita adiuvante e ha lo scopo di eliminare eventuali cellule cancerose e, di conseguenza, diminuire la probabilità di recidiva.

Il farmaco adiuvante più utilizzato è il *5-fluorouracile (5-FU)* [48], che viene spesso abbinato ad una vitamina, l'*acido folinico*, che aiuta a potenziarne l'effetto [49]. Nei carcinomi a stadi più avanzati viene utilizzato l'*oxaliplatino*, *irinotecan*, *bevacizumab* [48,50,51] e *cetuximab* [48,52,53]. L'oxaliplatino spesso viene somministrato insieme alla capecitabina (XEOX) per un trattamento più efficace [54].

Studi recenti hanno tuttavia dimostrato come la combinazione di oxaliplatino, 5-FU e acido folinico (FOLFOX) abbia un'azione ancora più potente nel trattamento dei carcinomi a stadio avanzato o metastatici [55,56]. È stato osservato che molti pazienti sottoposti a chemio-terapia risultano resistenti al trattamento con 5-FU [57] ma non alla sua combinazione con altri chemio-terapici [58-61].

Altri studi riportano come molti pazienti possono sviluppare chemio-resistenza anche agli altri farmaci in uso ed è per questo che negli ultimi anni si sta cercando di focalizzare l'attenzione sulla scoperta di nuovi target terapeutici e di nuovi potenziali trattamenti.

Nonostante gli enormi progressi della medicina, la probabilità di recidiva è comunque alta e si sta quindi valutando la possibilità di utilizzare sostanze anti-tumorali nuove rispetto alla medicina tradizionale.

Recentemente, diversi studi hanno focalizzato la loro attenzione sull'utilizzo di sostanze naturali medicamentose prese in prestito dalla medicina Ayurvedica e dalla medicina cinese, che sembrano avere degli effetti anti-tumorali [62,63]. Si pensa che questa tipologia di "medicina alternativa" potrebbe essere utilizzata in combinazione con la medicina tradizionale per aumentarne gli effetti e contrastare il fenomeno della chemio-resistenza [64-69]. Le piante utilizzate dalla medicina alternativa sono ricche di sostanze che hanno effetti terapeutici tra cui si pensa anche un probabile effetto chemio-preventivo [63,70,71].

Una delle piante maggiormente utilizzate in medicina ayurvedica è la *Tinospora cordifolia*, la quale sembra avere effetti su molte attività biologiche, inclusa quella anti-proliferativa [72-74].

La *T. cordifolia*, conosciuta anche col nome *Guduchi*, appartiene alla famiglia delle Menispermaceae e annovera vari principi attivi appartenenti a differenti classi, come alcaloidi, diterpenoidi, glicosidi, steroidi, fenoli, lattoni e polisaccaridi [75,76].

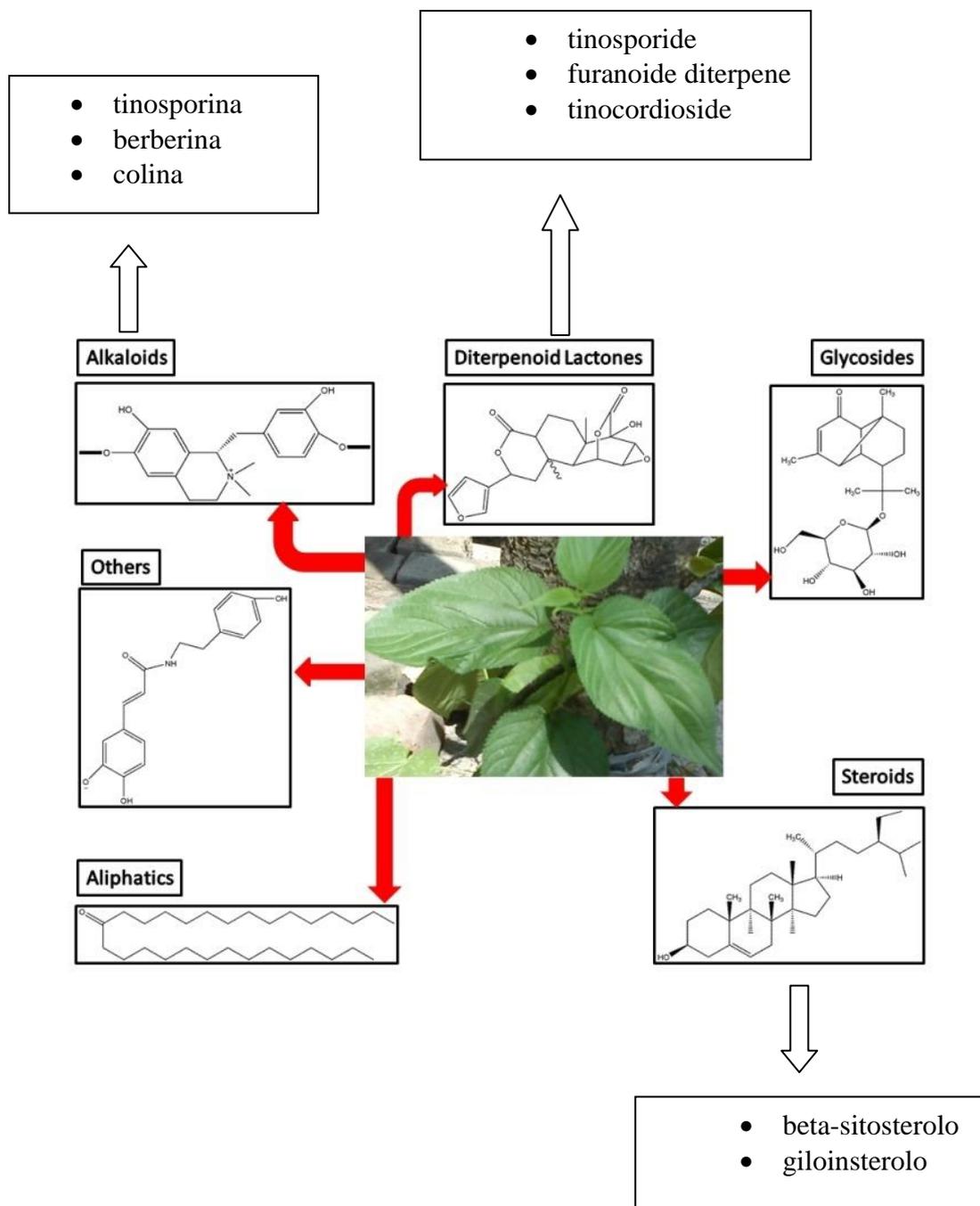


Fig.5 Composizione chimica della *Tinospora cordifolia* (Saha S. and Ghosh S., *Anc Sci Life*. 2012) con alcuni dei principi attivi (Kirti Sinha et.al. *Indian Journal of Tradit Knowledge* 2004)

I differenti principi attivi della *Tinospora cordifolia* mostrano un'azione terapeutica nei confronti di diverse patologie. Molti studi, infatti, riportano che queste sostanze sembrano avere un potenziale ruolo anti-infiammatorio, anti-microbico, anti-osteoporotico, anti-allergico, anti-proliferativo e anti-diabetico [76-81]

Tra questi composti, gli alcaloidi isoquinolinici, come ad esempio la *berberina* (BBR), si pensa siano i principali responsabili degli effetti benefici di questa pianta con proprietà medicamentose.

In passato, la BBR veniva utilizzata per curare fenomeni diarroici [82,83] e, più recentemente, è stata dimostrata la sua azione efficace nel trattamento di gastroenteriti, diabete, iperlipidemia, malattie cardiovascolari, disturbi infiammatori, iperglicemia e obesità [84-87]. Tuttavia, ulteriori studi hanno focalizzato la loro attenzione sulla potenziale attività anti-tumorale della BBR [88-92], dimostrata anche per il carcinoma del colon [93-95]. I meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto anti-tumorale della BBR sono molteplici, tra cui: la capacità di indurre morte cellulare attraverso l'arresto del ciclo cellulare [89,96], l'inibizione di *pathway* di sviluppo cellulare [97] e l'induzione dell'apoptosi [98-100], oltre ad un'azione anti-infiammatoria [100,101].

Infatti, molti studi hanno focalizzato la loro attenzione sull'espressione di geni implicati nel fenotipo tumorale che vengono modulati in seguito a trattamento con la BBR. Essa esplica attività anti-apoptotica [102], anti-infiammatoria e anti-ossidante [103], portando all'arresto del ciclo cellulare, all'apoptosi e all'autofagia nelle cellule tumorali [93,104].

CELLULE STAMINALI TUMORALI

La carcinogenesi colo-rettale è causata da una serie di alterazioni genetiche ed epigenetiche che si accumulano nelle cellule originarie del tumore. Inizialmente, secondo il modello stocastico, si pensava che ogni popolazione cellulare tumorale avesse una stessa, seppur bassa, probabilità di rigenerare il tumore a seguito di mutazioni accumulate progressivamente.

Negli ultimi anni, evidenze sperimentali hanno supportato invece la tesi del modello gerarchico, secondo la quale solamente una piccolissima sottopopolazione di cellule staminali tumorali adulte (CST) è in grado di innescare e sostenere la crescita tumorale [105-108] (Fig.5). Le CST possiedono la capacità di ricreare l'eterogeneità tumorale, a seguito della loro elevata plasticità che permette loro di dare origine a tutte le differenti popolazioni cellulari del tumore [109-112].

Questo nuovo modello è stato ampiamente utilizzato anche per spiegare l'insorgenza dei **tumori al colon-retto** [113-115].

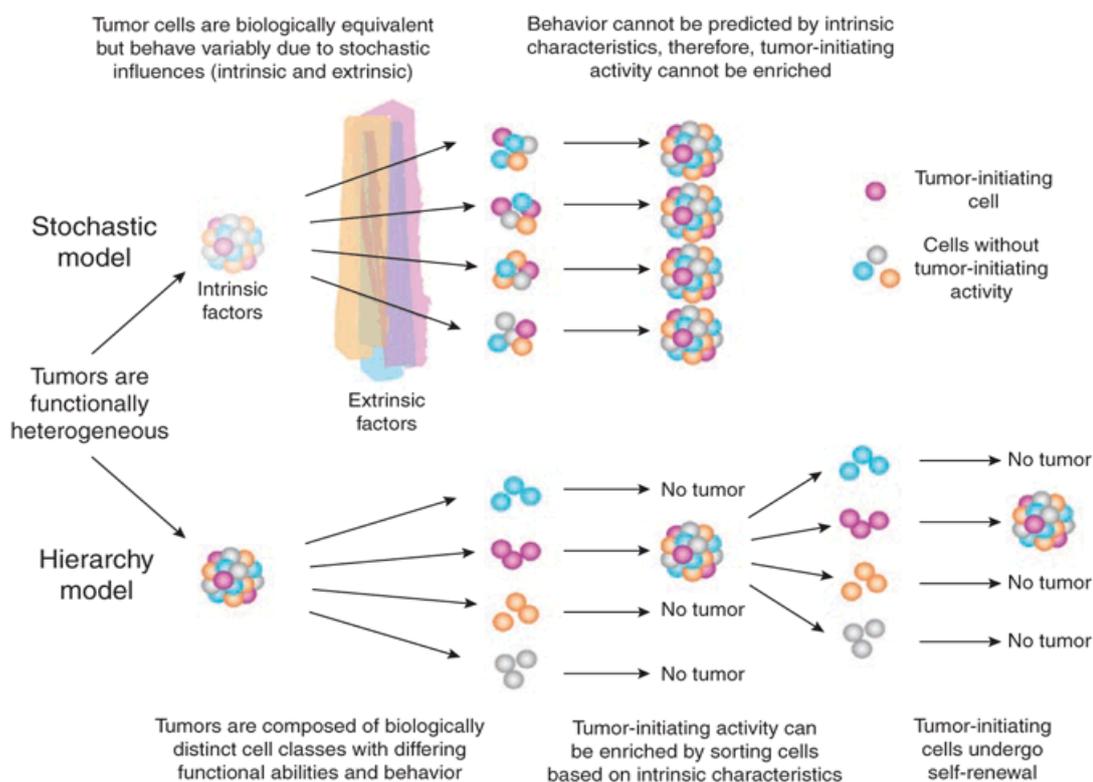


Fig.5 Modello stocastico versus modello cellule staminali

(Dick John E. Stem cell concepts renew cancer research, *Blood* 2008)

Caratteristiche delle Cellule Staminali Tumoralì

La popolazione di CST presenta sia attività tipiche delle cellule tumorali che caratteristiche simili alle cellule staminali normali (CSN), ossia la popolazione cellulare deputata alla fisiologica omeostasi tissutale, quali capacità di auto-rinnovamento, stato indifferenziato e multi-potenzialità (ovvero la capacità di generare cellule mature appartenenti a diversi tipi cellulari) [116]. Le CST sono in grado di dare nuovamente origine a tumori se trapiantate *in vivo* in topi immunodeficienti [117,118].

Le caratteristiche principali distintive delle CST, che le differenziano dalle CSN, sono molteplici. Innanzitutto, esse hanno una elevata **plasticità**, in quanto riescono a ricreare l'eterogeneità intra-tumorale e inter-tumorale, dando origine alle diverse popolazioni cellulari [109-112] (Fig.5), ma possiedono anche una elevata e incontrollata **capacità proliferativa**, che permette loro di evadere dal normale controllo dell'omeostasi tissutale. Le CST, a causa di alterazioni geniche specifiche, tendono ad avere un numero maggiore di **divisione simmetriche** (ossia da una cellula staminale si originano due cellule figlie staminali) piuttosto che asimmetriche (ossia da una cellula staminale si origina una cellula figlia staminale ed una più differenziata) tipiche invece delle CSN [116,119,120].

Le CST presentano alterazioni a livello di *pathway* di trasduzione del segnale implicati in crescita, migrazione, sviluppo e differenziamento cellulare (Fig.6), quali il *pathway* di **Wnt** [121,122], **Notch** [122-125], **Hedgehog** [126,127], **TGF- β** [128,129], **Hippo-YAP** [130], **STAT-3** [131,132], **PTEN** [133] e così via.

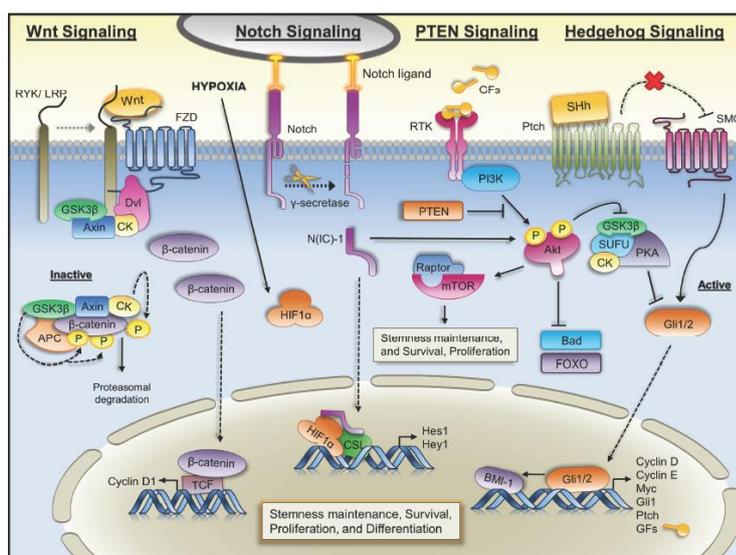


Fig.6 Alterazioni nei principali *pathway* di trasduzione del segnale, quali quello di **Wnt**, **Notch**, **Hedgehog**, **PTEN**. Questi sono implicati nello sviluppo e mantenimento delle cellule staminali tumorali, deputate allo sviluppo del tumore.

Fonte: Templeton A.K. "Cancer stem cells: progress and challenges in lung cancer", *Stem Cell Invest* 2014

Le CST sono capaci di accumulare diverse mutazioni nel loro DNA e di tramandarle alle generazioni successive, a causa di **alterazioni nei meccanismi di riparazione** [134].

Un'altra delle peculiarità fondamentali è la loro capacità di **resistere ai principali trattamenti** terapeutici, utilizzati anche nella cura del carcinoma del colon-retto (Fig.7), quali chemio-terapia [135-137] e radio-terapia [138]: vanno così a costituire una piccola riserva di cellule responsabili della recidiva dei tumori e della formazione di metastasi.

I meccanismi che inducono **chemio-resistenza** utilizzati dalle CST sono molteplici:

- Elevata espressione di proteine appartenenti alla famiglia dei **trasportatori ABC** (ATP-Binding Cassette) che intervengono nel trasporto trans-membrana di diverse sostanze tra cui anche l'efflusso di sostanze tossiche e farmaci [139,140]. Le proteine ABC sono raggruppate in 7 diverse sottofamiglie (ABC A-G) [141] e mostrano una diversa specificità tissutale sia nell'ambito dei differenti organi che all'interno dello stesso, come ad esempio lungo tutto l'intestino [142]. I trasportatori ABC risultano sovra-espressi in molti tipi di tumore, tra cui quello al colon [143-146]. Tuttavia, negli ultimi anni, molti studiosi hanno dimostrato che le proteine ABC sono sovra-esprese specificamente nelle cellule staminali tumorali, contribuendo così allo sviluppo di un loro fenotipo chemio-resistente [147-150]. Inoltre, Kobayashi e colleghi hanno studiato il ruolo che il *pathway* di Wnt- β catenina ha nella regolazione dell'espressione di ABCC3. Quest'ultimo è un componente della superfamiglia delle proteine ABC e la sua espressione viene up-regolata dal segnale Wnt, causando un maggior effetto chemio-resistente [151].
- Over-espressione di enzimi coinvolti nelle attività di detossificazione cellulare da specie reattive dell'ossigeno [152], tra cui l'ALDH1 [153,154]. **ALDH1** è un membro della famiglia delle ossido-reduttasi ALDH, ossia enzimi capaci di catabolizzare la conversione di aldeidi nei loro rispettivi acidi carbossilici [155]. L'attività di questi enzimi è richiesta per il metabolismo di molte biomolecole importanti per l'organismo, tra cui l'acido retinoico [156], i folati e la betaina [157]. Gli enzimi ALDH sembrano essere coinvolti anche in altri processi cellulari, come il controllo su *pathway* di differenziamento cellulare, e giocano un ruolo importante a livello delle cellule staminali [158]. Studi recenti hanno dimostrato come l'isoforma ALDH1 risulti up-regolata nelle cellule staminali tumorali e venga quindi utilizzata come marker specifico [159-162]. Le isoforme ALDH1A1 e ALDH1B1 sono quelle maggiormente coinvolte nei differenti tipi di tumore [163].

- Alterazione nei *pathway* di segnalazione apoptotici, permettendo così alle cellule staminali tumorali di rimanere in vita e alimentare la formazione del tumore. Alcuni lavori hanno dimostrato come le CST riescano a produrre Interleuchina 4 (IL-4), una proteina coinvolta normalmente nelle reazioni immunitarie, che conferisce resistenza ai processi di morte cellulare programmata (**apoptosi**) attraverso la sovra-espressione di molecole anti-apoptotiche [164]. Le CST mostrano difetti di espressione genica o a livello di proteine anti-apoptotiche o a livello di proteine pro-apoptotiche [165-167].
- **Stato quiescente** delle CST, poiché esse anche se mostrano un'elevata capacità proliferativa e di auto-rinnovamento, risultano relativamente quiescenti a causa di un ciclo cellulare più lungo rispetto alle cellule staminali normali. Ciò sembra essere dovuto ad un arresto in fase G_0 o in uno dei checkpoint tra una fase e l'altra del ciclo cellulare [168]. Le CST, in questo modo, risultano resistenti alla chemio e radioterapia, poiché questi trattamenti sono diretti verso cellule in attiva proliferazione [169-171].

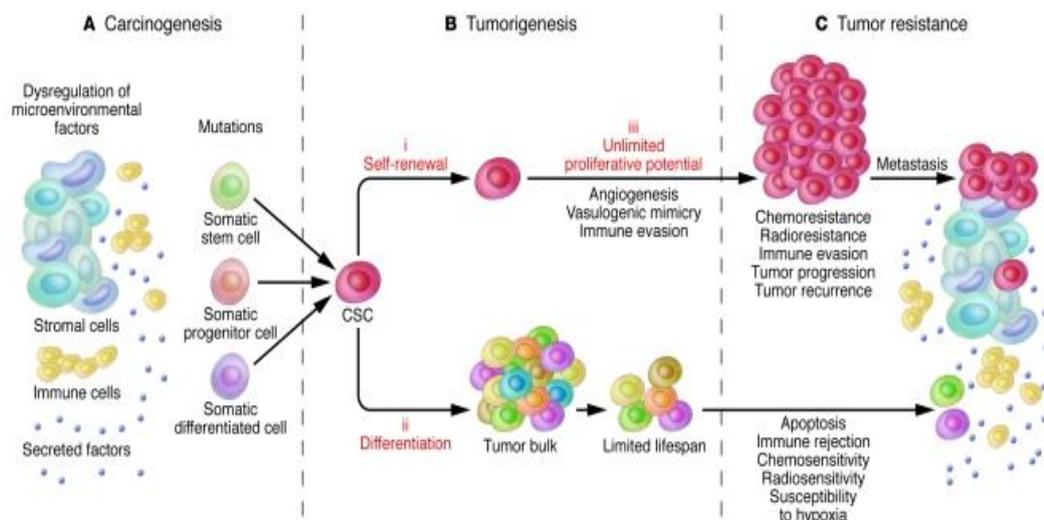


Fig.7 Le CST presentano molteplici caratteristiche che le rendono particolarmente invasive e in grado di generare il tumore, sia in sedi primarie che secondarie, causando così la formazione di metastasi. Tra le loro peculiarità risulta fondamentale la loro capacità di evadere dai principali trattamenti, tra cui chemio e radioterapia (Frank NY, *et. al.*, “The therapeutic promise of the cancer stem cell concept”. *The Journal of Clinical Investigation* 2010).

I tumori di natura epiteliale, come il cancro del colon-retto, presentano un'alterazione dell'omeostasi delle cellule epiteliali che, attraverso un processo di **transizione epitelio-mesenchimale (EMT)**, perdono le capacità adesive cellula-cellula e acquisiscono un fenotipo mesenchimale migratorio. Ciò è un evento cruciale nel processo metastatico [172], che contribuisce anche al fenomeno di chemio-resistenza [148].

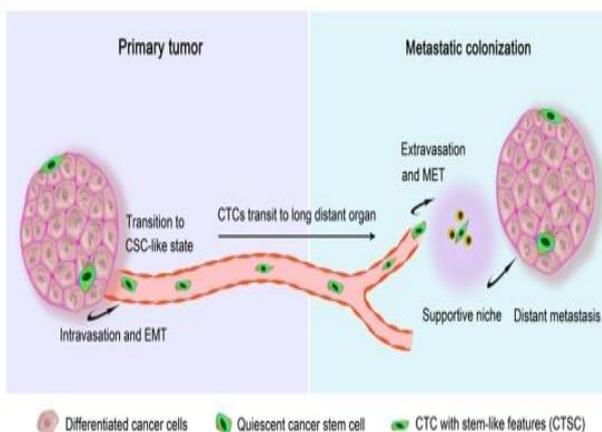
Le cellule che vanno incontro a EMT potrebbero essere proprio le CST, dando origine a cellule staminali tumorali metastatiche in grado di allontanarsi dal tumore primario ed andare in circolo per poi metastatizzare in una nuova sede.

Ciò è dovuto alle molteplici caratteristiche delle CST, quali capacità di iniziare e sostenere la crescita tumorale, la loro plasticità [173,174] e la loro instabilità genetica, che le renderebbero capaci di creare particolari nicchie per lo sviluppo di **metastasi** [175-177]. Questo processo di EMT sembra essere controllato da *pathway* di segnalazione cellulare di Wnt e TGF β , i quali possono essere entrambi attivati in maniera aberrante durante la carcinogenesi [178-180].

Il processo di EMT è scatenato da una serie di eventi che portano le cellule epiteliali a perdere le loro capacità adesive e acquisire motilità grazie alla perdita delle giunzioni aderenti cellula-cellula e ad un rimodellamento del citoscheletro.

In questo modo, le cellule staminali tumorali acquistano maggiore invasività e sono in

Fig.8 Tratto da: Ming Y., Li Y., *et. al.*, Front in Pharmacol 2017



grado, attraverso il flusso circolatorio, di disseminarsi in tutto l'organismo

(Fig.8). Una volta arrivate in sede secondaria, soprattutto a livello epatico e polmonare, le CST vanno incontro ad un processo inverso, definito **transizione mesenchimale-epiteliale (MET)**, per il quale le

cellule epiteliali riacquisiscono le loro capacità di formare giunzioni aderenti, e al contempo, perdono la capacità migratoria, riuscendo così a ripopolare questa nuova sede [181,182].

Date tutte queste peculiarità, le CST sono capaci di replicare formando dei **cloni** in colture cellulari *in vitro*, che crescono in sospensione e che hanno la caratteristica forma di sfera (Fig.9A-B). Le prime cellule staminali tumorali sono state isolate da pazienti e linee cellulari immortalizzate di cancro al seno, e venivano quindi inizialmente definite "mammo-sfere" [183-186]. Successivamente, la scoperta di queste cellule iniziatrici del cancro ha dato il via alla scoperta e all'isolamento di CST anche da altri tipi di tumori solidi, come fegato, pancreas, distretto testa-collo, polmone [187] ed anche a livello del colon in cui vengono definite **colon-sfere** o anche Co-CST [188].

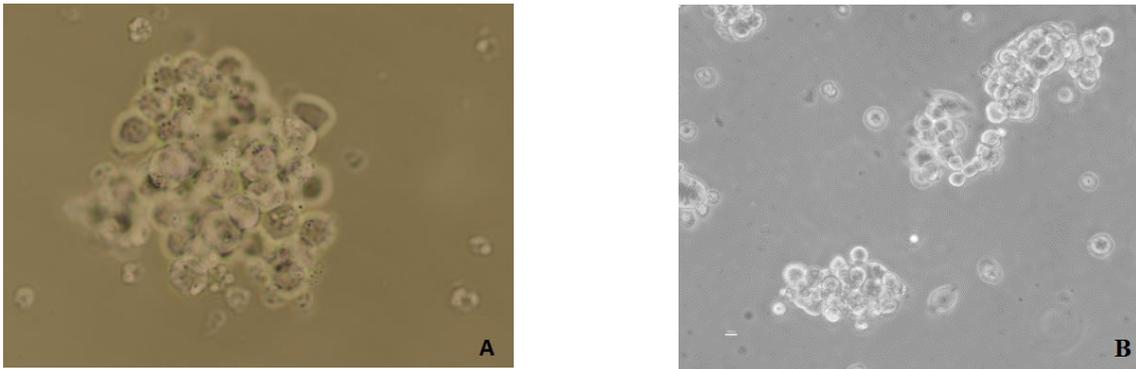


Fig.9 Immagini al microscopio ottico delle sfere in sospensione della linea cellulare immortalizzata HCA7. A) 20X; B) 40X

Le CST hanno la peculiarità di esprimere **marker di superficie** specifici che ne permettono l'isolamento in coltura. Tali marker che sono comuni a quelli delle cellule staminali normali e delle cellule progenitrici, evidenziandone la probabile derivazione e origine.

I primi studi sull'identificazione delle Co-CST sono stati realizzati nel 2009 [114] e dimostrarono che cellule CD133⁺ isolate dal tumore al colon presentavano un'elevata aggressività e capacità replicativa. Le cellule **CD133⁺** isolate erano capaci di formare delle sfere in sospensione in coltura e, se trapiantate in topi immunodeficienti, erano in grado di rigenerare il tumore [114,117]. Successivamente, è stato dimostrato come il CD44, una proteina trans-membrana implicata nell'adesione cellulare, possa essere proposto come marker alternativo [189]. Le cellule **CD44⁺** isolate da carcinomi colo-rettali hanno caratteristiche simili alle CST, in quanto riescono a formare delle sfere in coltura a partire da una singola cellula e rigenerano il tumore se trapiantate *in vivo* [190,191].

Origine delle Cellule staminali Tumorali

Le cellule staminali tumorali sono state isolate da diversi tipi di tumori solidi ma anche da tumori al sistema ematopoietico [192]. La loro origine è tutt'oggi ancora poco chiara e vi sono diverse teorie che cercano di spiegarla. Si pensa che esse derivino o da cellule staminali normali o da cellule progenitrici oppure da cellule differenziate che vanno incontro a de-differenziamento [193] (**Fig.10**).

Il **colon** ha un'organizzazione strutturale complessa e l'epitelio di rivestimento della mucosa, come già detto in precedenza, è formato da numerose invaginazioni che penetrano nel tessuto connettivo sottostante, definite **cripte di Lieberkuhn** (**Fig.10**). Queste ultime hanno la funzione di mantenere l'**omeostasi** del tessuto e sono coinvolte anche nella sua **rigenerazione**, con produzione di nuove cellule funzionali, in caso di danno.

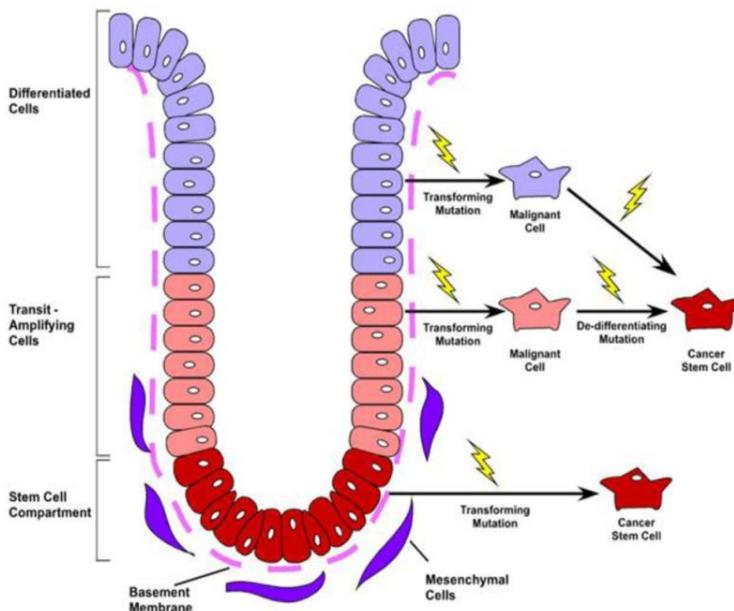
Le cellule intestinali della cripta sono rinnovate da cellule staminali multipotenti localizzate alla base della cripta stessa, le quali si dividono asimmetricamente spostandosi verso il lume del colon e, dopo un certo numero di divisioni, si differenziano nelle popolazioni tipiche di questo organo: enterociti, ossia le cellule epiteliali di rivestimento della mucosa con funzione assorbente; cellule di Goblet, ossia cellule caliciformi mucipare con la funzione di secernere muco; cellule enteroendocrine, ossia cellule deputate alla secrezione di ormoni peptidici.

Le CS normali che si trovano alla base della cripta presentano una elevata espressione di LGR5⁺, che viene utilizzato come marker superficiale per l'isolamento e la caratterizzazione delle cellule di questo compartimento [194].

Il gene LGR5 codifica per una proteina che fa parte del complesso recettoriale a cui si legano le proteine Wnt [195], prendendo parte ai segnali di trasduzione cellulare di questa via.

Le CST potrebbero derivare da **cellule staminali normali** del tessuto in cui il tumore si è sviluppato, a causa di un accumulo di grandi quantità di alterazioni geniche a livello dei principali *pathway* che regolano il normale processo di auto-rinnovamento.

Questo è ciò che accade a livello delle cripte del colon, alla cui base sono presenti cellule staminali che rigenerano il tessuto e che possono andare incontro a proliferazione incontrollata e trasformarsi in CST capaci di generare il tumore [196] (Fig.10).



Fonte: Anderson E.C. *et al.* "The role of Colorectal Cancer Stem cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response. *Cancers* 2001

Fig.10 Struttura delle cripte del colon. Alla base sono presenti le **cellule staminali** responsabili del rinnovamento cellulare, le quali vanno incontro a divisioni rapide per dare origine a **cellule progenitrici** o della zona di transizione (*transit-amplifying cells*). Queste ultime, dopo 5-6 divisioni perdono progressivamente la staminalità e si differenziano in tutte le cellule tipiche dell'epitelio intestinale: enterociti, cellule di Goblet e cellule enteroendocrine. Le CST possono derivare: dalle cellule staminali tumorali alla base della cripta (in rosso); dalle cellule progenitrici nella zona di transizione (in rosa); oppure dalle cellule differenziate all'apice della cripta (in viola), le quali vanno incontro a de-differenziamento.

Infatti, le CST utilizzano gli stessi *pathway* di segnalazione coinvolti nei processi di replicazione adottati dalle CSN, per la fisiologica rigenerazione tissutale [197-199].

Le CST potrebbero derivare anche da una categoria di **cellule** chiamate **progenitrici** o *transit amplifying cell* [200], ossia la prima generazione cellulare derivante dalle cellule staminali che possiedono una grande capacità di dividersi ma in misura minore rispetto alle staminali.

Se una cellula progenitrice va incontro a trasformazione maligna può riacquisire capacità *stem-like* e concorrere così allo sviluppo del tumore [201].

Tuttavia, diversi studi hanno suggerito che le **cellule somatiche differenziate** del tessuto potrebbero riattivare i *pathway* di segnalazione cellulare implicati nei processi di auto-rinnovamento, acquisendo proprietà *stem-like* e causando così una trasformazione neoplastica [202].

A seguito di ciò sono state avanzate due possibili ipotesi sulla origine delle Co-CST:

- **TEORIA BOTTOM-UP**
- **TEORIA TOP-DOWN**

La prima teoria supporta la tesi che vede le cellule staminali normali alla base della cripta come responsabili dell'inizio della tumorigenesi e della successiva invasione della regione apicale sovrastante la cripta [203].

La seconda teoria, invece, sostiene che le cellule differenziate all'apice della cripta presentano un elevato tasso di mutazioni geniche tali per cui possono dare origine a cellule staminali tumorali in grado di invadere tutto l'epitelio fino alla base della cripta [203-205].

Nicchia staminale e microambiente tumorale

Il microambiente in cui le cellule staminali risiedono (**nicchia staminale**) gioca un ruolo cruciale nel mantenimento delle loro caratteristiche e nel regolare i processi di differenziamento e proliferazione. Le cellule staminali si trovano localizzate all'interno di una fitta rete formata da vasi sanguigni, cellule del sistema immunitario, adipociti, fibroblasti e componenti della matrice extra-cellulare, che assicurano un corretto ambiente attorno al quale esse possono proliferare e mantenere la loro staminalità. Le cellule staminali comunicano con il microambiente attraverso molecole di adesione, che legano la matrice extra-cellulare, e segnali molecolari solubili, quali citochine e fattori di crescita, che scambiano con le diverse componenti della nicchia [206].

Alterazioni della nicchia staminale possono contribuire alla trasformazione delle CS normali in cellule staminali tumorali, portando alla formazione di un **microambiente tumorale** che favorisce la proliferazione delle CST e di conseguenza lo sviluppo del tumore [207-209].

In prima istanza, il microambiente tumorale fa sì che cellule differenziate revertano ad un fenotipo indifferenziato [210] ed acquisiscano una elevata plasticità che permette loro di ricreare l'eterogeneità tumorale, caratteristiche tipiche delle CST [211]. Un ruolo cruciale viene affidato anche ai fibroblasti associati al tumore che, in maniera diretta attraverso l'interazione con le cellule del tumore ed indiretta attraverso la secrezione di molecole, contribuiscono alla progressione tumorale [212,213]. Tali fibroblasti possiedono anche capacità pro-invasive in sede di metastasi, grazie a processi di transizione epitelio-mesenchimale, che fanno sì che venga creata una nicchia pre-metastatica in grado di facilitare le CST a riformare il tumore in sede diversa da quella primaria [212].

In definitiva, avviene uno scambio reciproco di segnali tra le CST e il microambiente tumorale che fa sì che venga creato l'ambiente adatto per lo sviluppo del tumore, sostenuto dalle CST [214].

2.SCOPO DEL PROGETTO

Lo scopo del mio progetto di dottorato è stato quello di isolare le cellule staminali tumorali da linee cellulari immortalizzate di adenocarcinoma colon-rettale e, successivamente, caratterizzarle cercando di focalizzare l'attenzione sui tratti che differenziano le cellule staminali tumorali da quelle della linea tumorale.

Successivamente, stabiliti quali fossero i tratti discriminanti tra la popolazione cellulare tumorale e staminale tumorale, ho condotto studi sulla linea HCA7, utilizzando un estratto di *T. cordifolia*, pianta suggerita dalla medicina ayurvedica avere un'azione presumibilmente chemio-preventiva [76].

Le popolazioni cellulari della linea HCA7 poste in esame sono così state trattate con l'estratto *in toto* della *T. cordifolia* e con uno dei suoi principi attivi, la berberina (BBR).

L'obbiettivo era testare l'effetto di queste sostanze sull'espressione di diversi geni selezionati sulla base del loro coinvolgimento in attività tipiche della popolazione tumorale, come ad esempio: auto-rinnovamento, progressione tumorale, trasformazione maligna, mobilità cellulare ed invasività.

Questi studi preliminari potrebbero dare risultati utili nell'evidenziare *pathway* cellulari coinvolti nella tumorigenesi del cancro del colon, che potrebbero essere utilizzati in futuro come eventuali target terapeutici.

3.MATERIALI & METODI

COLTURE CELLULARI

HT29, CaCo2 e HCA7, linee cellulari immortalizzate isolate da adenocarcinoma al colon-retto, gentilmente fornite da i colleghi della Patologia generale dell'UNIBO, sono state inizialmente seminate in DMEM con aggiunta di 10% di FBS (fetal bovine serum), 1% di penicillina/streptomina, 1% di L-Glutamina e 0.2% di fungizone.

Le colture cellulari sono state quindi incubate per diverse settimane a 37 °C e 5% di CO₂, per permetterne la loro replicazione ed utilizzo in esperimenti successivi.

Isolamento e caratterizzazione delle CST da linee tumorali

Una volta raggiunta la semi-confluenza in terreno standard, le cellule appartenenti alle tre diverse linee tumorali sono state coltivate in terreno selettivo privo di siero e addizionato con fattori di crescita specifici, come EGF (1 ng/μL), FGF (10 ng/μL) e vitamina B27 (50X), che consente di selezionare le CST tra le CT.

Le CST, in tali condizioni, sono infatti in grado di replicare formando dei cloni che crescono in sospensione sotto forma di aggregati sferici, a discapito delle CT che non riescono ad aderire alla fiasca e vanno quindi incontro ad apoptosi. La formazione delle sfere necessita di un periodo di almeno 15 giorni dalla semina iniziale. Alla comparsa dei primi cloni di CST, è stato raccolto il surnatante contenente le sfere, centrifugato 10' a 800 rpm e, successivamente, è stato disgregato il pellet mediante tripsina. Ottenuta una replicazione consistente delle sfere, è stato utilizzato il "CD44 S-pluriBead kit" (pluriSelect), allo scopo di verificarne l'effettiva appartenenza alla popolazione di cellule staminali tumorali. La verifica di staminalità delle cellule delle colon-sfere ha previsto che le cellule, preventivamente legate a biglie coniugate all'anticorpo selettivo per un marcatore delle CST (CD44), siano state successivamente filtrate da una membrana che trattiene solo le cellule CD44⁺ [189].

Le cellule legate alle biglie e trattenute nel filtro sono state separate mediante l'utilizzo di un buffer che rompe i legami anticorpo-proteina e subito dopo sono state rimesse in coltura al fine di ottenere un'espansione selettiva di staminali tumorali.

SOSTANZE NATURALI UTILIZZATE E PREPARAZIONE DEI LORO

ESTRATTI

L'estratto di *Tinospora cordifolia* è stato gentilmente fornito dal Prof. Poli dell'UNIBO e dal suo team, che a loro volta hanno reperito la pianta da "Maharishi Ayurveda" (Verona, Italia). L'estratto è stato ottenuto solubilizzando 300 gr di *T. cordifolia* in 2 L di MeOH/H₂O (1:1) e successiva sonicazione per 1 h.

L'estratto è stato quindi filtrato mediante Büchner-funnel ed i solventi fatti evaporare sotto vuoto a 40 °C. La procedura è stata ripetuta per tre volte ottenendo così 28.4 g di estratto crudo.

Mediante analisi con spettrofotometro UV è stato rilevato lo spettro di assorbimento UV dell'estratto, che presenta i tre massimi picchi di assorbimento caratteristici della berberina (BBR) (lunghezze d'onda: 228, 266 e 342 nm), uno degli alcaloidi contenenti negli estratti della *T. cordifolia* (Grafico 1).

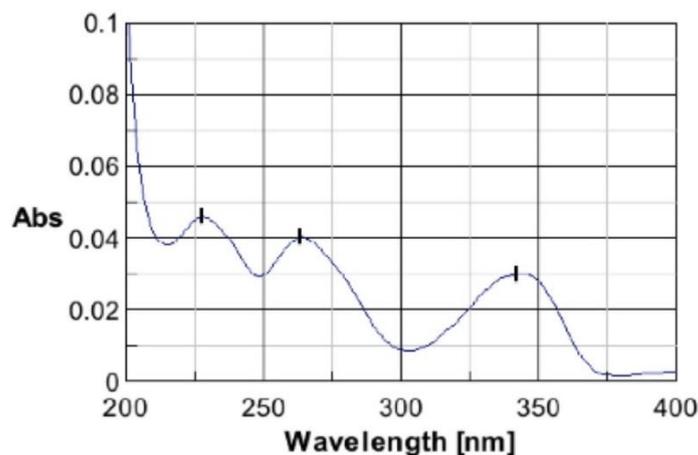


Grafico 1 Spettro UV dell'estratto di *T. cordifolia* solubilizzato in metanolo

Le analisi quantitative preliminari sono state condotte con l'impiego di HPLC-UV alla lunghezza d'onda di 266 nm ed i dati così ottenuti sono stati successivamente confermati mediante LC-MS e MS (Waters).

L'estratto di *T. cordifolia* è stato sottoposto a standardizzazione, utilizzando una soluzione in polvere di berberina pura commerciale come standard di riferimento (Sigma-Aldrich).

Per interpolazione sulla retta di taratura riportata nel grafico 2, è stata calcolata la percentuale p/p di berberina nell'estratto di *T. cordifolia*.

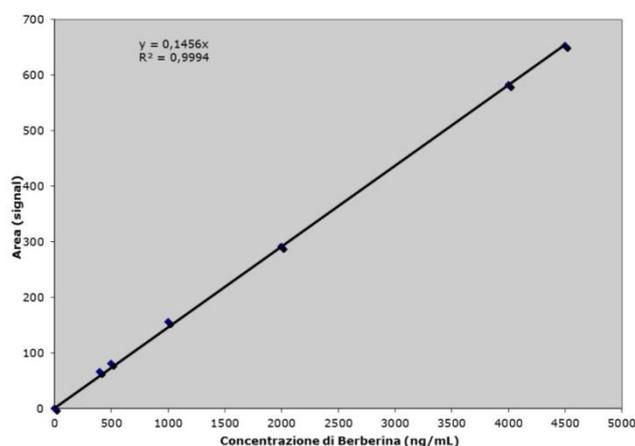


Grafico 2 Retta di taratura della soluzione standard di berberina

Il titolo della berberina nell'estratto di *T. cordifolia* è risultato essere 12% p/p, corrispondente a 120 mg/g di estratto puro.

Saggio di vitalità cellulare

La soluzione madre di *T. cordifolia* è stata preparata dissolvendo 0.0167 gr di estratto in 1 ml di DMSO (*dimethyl sulfoxide*). La soluzione di BBR pura è stata risospesa in una soluzione stock di 5.4 mM, sempre in DMSO. Entrambe le soluzioni sono state preparate al momento dell'utilizzo e la concentrazione della BBR in esse è la medesima.

In seguito, da queste soluzioni di partenza sono state ottenute diverse diluizioni alle concentrazioni desiderate, utilizzando il terreno di coltura come solvente.

Le cellule della linea HCA7 sono state seminate in una *multi-well* da 96 pozzetti ad una densità di 10^4 cellule per pozzetto, in 100 μ l di terreno di crescita, e incubate per 24 h in modo tale da permettere l'adesione cellulare.

Le cellule sono state trattate con diluizioni seriali di *T. cordifolia* (30.9 μ g/ml, 92.7 μ g/ml, 154.5 μ g/ml, 309.0 μ g/ml) e BBR (10 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M) ed ogni concentrazione è stata impiegata in triplicato biologico. Le cellule di alcuni pozzetti sono state trattate con terreno di coltura e DMSO, utilizzati come trattamento di controllo. Dopo 24 e 48 h di trattamento, la vitalità cellulare è stata misurata con "PrestoBlue™ Reagent Protocol" (Invitrogen). La **figura 11A** e la **figura 11B** mostrano i risultati del saggio PrestoBlue™ alle 48 h di trattamento. I dati riguardanti le 24 h di trattamento non sono stati riportati poiché il saggio non ha evidenziato effetto sulla vitalità cellulare. In breve, la soluzione PrestoBlue™ è stata aggiunta in ogni pozzetto contenente la soluzione di trattamento e di controllo. La piastra è stata incubata a 37 °C per 1 h, dopodiché è stata misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di eccitazione di 570 nm ed alla lunghezza d'onda di emissione di 620 nm mediante un lettore di micro-piastre ad assorbanza (Sunrise™, Tecan Trading AG). La percentuale di cellule vitali è stata determinata mettendo a confronto i valori di assorbanze nelle cellule sottoposte a trattamento rispetto a quelle presenti nei pozzetti con il controllo negativo (DMSO). I risultati sono presentati come media \pm deviazione standard a seguito di tre misure.

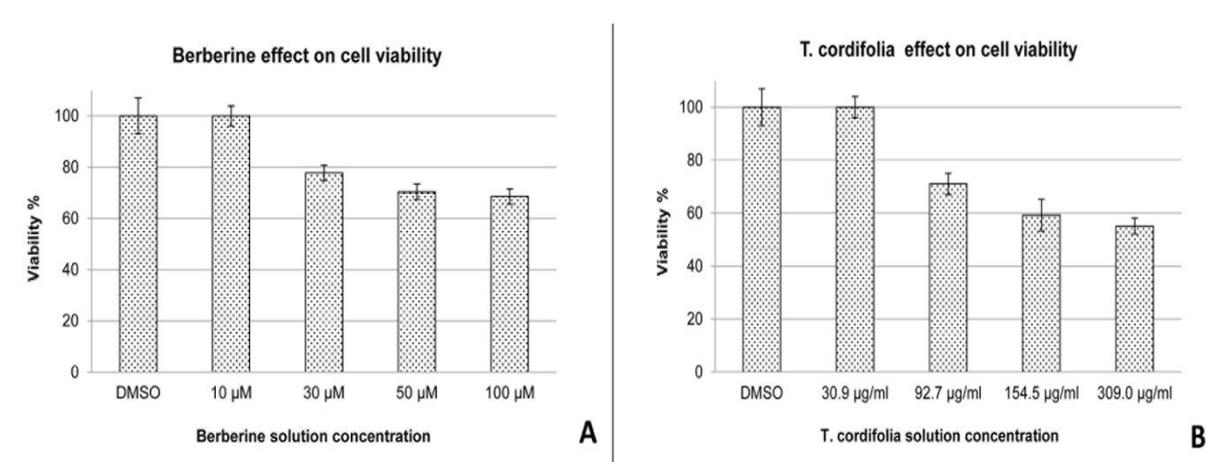


Figura 11: A) percentuale di cellule vitali a seguito del trattamento con berberina B) percentuale di cellule vitali dopo trattamento con l'estratto di *T. cordifolia*. Le cellule sono state sottoposte a ciascuno dei due trattamenti per 48 h.

Trattamenti con un principio attivo della *Tinospora Cordifolia*, la berberina, e l'estratto in toto

L'estratto della *T. cordifolia* e la BBR pura sono state utilizzate per valutare il loro effetto sulla popolazione tumorale e sulla popolazione staminale tumorale della linea cellulare HCA7.

a) Popolazione tumorale delle HCA7

A seguito del saggio di vitalità cellulare, ho scelto le 48 h come tempistica di trattamento, in base al fatto che mostra una percentuale di cellule vitali intorno a 75-80%. Le cellule sono state seminate in una *multi-well* da 6 pozzetti ad una densità di 10^5 cellule per pozzetto.

Le cellule sono state lavate con tampone fosfato salino (PBS) e incubate a 37 °C per 18 h con DMEM privo di siero (*serum starvation*) per permettere la sincronizzazione della popolazione cellulare nella fase G1 del ciclo replicativo, prima della valutazione dell'effetto di un trattamento farmacologico [215].

Al termine della “*serum starvation*”, le cellule sono state trattate con 30.9 μ g/ml e 92.7 μ g/ml di estratto di *T. cordifolia* e con 10 μ M e 30 μ M di BBR pura. L'utilizzo della BBR pura ha lo scopo di valutare gli effetti del principio attivo, escludendo qualsiasi altro effetto dovuto alla presenza degli eccipienti contenuti nell'estratto vegetale. Le cellule, inoltre, sono state sottoposte al trattamento con DMEM al 2% di FBS contenente esclusivamente il solvente utilizzato per solubilizzare gli estratti (DMSO), il quale servirà da controllo negativo al fine di escludere gli eventuali effetti di quest'ultimo.

Tutti i trattamenti sono stati effettuati in triplicato biologico, utilizzando DMEM al 2% di FBS, antibiotici e L-Glutammina. Dopo 48 h di trattamento, le cellule sono state raccolte e processate per l'estrazione dell'RNA.

b) Popolazione staminale tumorale delle HCA7

Successivamente, ho sottoposto le sfere isolate dalle HCA7 alle medesime condizioni di trattamento dell'esperimento precedente, utilizzando dunque 92.7 µg/ml di estratto di *T. cordifolia* e 30 µM di BBR pura. Le concentrazioni di utilizzo dei trattamenti impiegati in questa parte sperimentale sono state scelte in base alla percentuale di cellule vitali e al grado di modulazione dei livelli di espressione genica, ottenuti dall'esperimento precedente condotto sulle CT della linea HCA7. Anche in questo caso è stata utilizzata una soluzione di controllo per poter valutare l'effetto reale della soluzione di trattamento.

Tutti i trattamenti sono stati effettuati in triplicato biologico, utilizzando DMEM al 2% di FBS, antibiotici e L-Glutammina. Dopo 48 h di trattamento, le cellule sono state raccolte e processate per l'estrazione dell'RNA.

**ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE, RETROTRASCIZIONE A CDNA E
AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR REAL-TIME**

L'RNA totale è stato estratto dalle CST selezionate e dalle CT, mediante il kit "GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit" (Sigma-Aldrich) e successivamente quantificato al NanoDrop (Thermo Scientific).

Un'aliquota di 500 ng di ciascun campione è stato retrotrascritto a cDNA, mediante il kit "PrimeScript™ RT Master Mix" (Takara Bio Inc.).

L'analisi dell'espressione genica sui campioni di cDNA è stata rilevata attraverso l'amplificazione con PCR Real-Time, utilizzando la metodica del SYBR® Green.

L'amplificazione avviene mediante l'utilizzo di *primers*, *forward* e *reverse*, specifici per ciascun gene analizzato e la quantità di amplificato prodotto viene rivelato dall'emissione di fluorescenza di un intercalante fluorescente che si lega alla doppia elica di DNA.

L'emissione di fluorescenza è proporzionale alla quantità di amplificato.

Le coppie di *primers* utilizzate nell'amplificazione di ciascun gene sono state acquistate sotto forma di saggi validati, presso la ditta Sigma-Aldrich (Milano).

Le reazioni di amplificazione sono state condotte sullo strumento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem). Ogni reazione è stata condotta in duplicato analitico e in ogni saggio è stato utilizzato un controllo negativo per poter escludere eventuali contaminazioni

biologiche. I livelli di espressione genica sono stati normalizzati su quelli di un gene costitutivamente espresso in questo cito-tipo, l'RPL13.

Analisi statistica

L'analisi statistica per il confronto dei livelli di espressione tra gruppi di campioni è stata effettuata mediante test *t* di Student, analizzando le medie dei delta-Ct. I valori di fold-change sono stati derivati dalla differenza delle medie (delta/delta-Ct) [216].

ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIE DI PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA DEL COLON-RETTO E DI INDIVIDUI SANI

Il materiale bioptico a mia disposizione è stato fornito dal reparto di Chirurgia 2 e dal reparto di Anatomia patologica dell'Arcispedale Sant'Anna di Ferrara, previa approvazione da parte del Comitato Etico della provincia di Ferrara.

Sono stati repertati i seguenti campioni:

- tessuto tumorale prelevato intra-operatoriamente da pazienti sottoposti a intervento chirurgico per cancro del colon-retto
- tessuto non tumorale prelevato intra-operatoriamente da pazienti sottoposti a intervento chirurgico per cancro del colon-retto
- biopsie di tessuto del colon prelevate in sede di valutazione clinica da individui sani da utilizzare come controllo

L'allestimento di colture cellulari primarie da frammenti di mucosa patologica e sana rispondeva alla necessità di replicare, su popolazioni cellulari *ex-vivo*, i risultati ottenuti dai trattamenti con l'estratto di *T. cordifolia* e BBR sulla linea immortalizzata HCA7.

In seguito all'asportazione chirurgica, il frammento bioptico del pezzo operatorio destinato alla nostra sperimentazione è stato immerso in una soluzione di trasporto, costituita da DMEM/F12, antibiotici e antimicotici, che permette la sopravvivenza cellulare a breve termine.

Successivamente, il materiale bioptico è stato prima lavato delicatamente in PBS finché la soluzione non è apparsa limpida; poi processato con un bisturi su una piastra Petri in modo da ottenere dei frammenti più piccoli. Questi ultimi sono quindi stati messi in una fiasca T25 in presenza di una soluzione per la digestione enzimatica (DMEM, antibiotici e Collagenasi I 1 mg/ml) e lasciati *over-night* a 37 °C.

Il giorno seguente, il contenuto della T25, contenente cellule e tessuto indigerito, è stato raccolto in un tubo da 15 ml e centrifugato 10' a 2000 rpm.

Il pellet è stato risospeso in DMEM/F12 al 10% di FBS e rimesso in coltura per circa 7 giorni nella stessa T25 in cui era avvenuta la digestione.

La verifica cito-tipica delle colture primarie ottenute dal materiale biotico, sia tumorale che normale è stata effettuata mediante saggio di immunofluorescenza.

Nel dettaglio, un'aliquota di cellule è stata seminata su vetrini copri-oggetto e incubati per 2 giorni con terreno di crescita per permetterne l'adesione. Successivamente, sono state fissate in metanolo freddo per 5'. Le cellule sono poi state lavate per 3 volte con PBS per eliminare tutti i residui di metanolo e immerse in una soluzione contenente TRITON X-100 0.1%, che va a permeabilizzare le membrane cellulari.

A seguire, i vetrini sono stati nuovamente lavati in PBS e posti 30' in albumina all'1% per bloccare i siti aspecifici. Le cellule sono così state incubate con soluzione contenente gli anticorpi primari diluiti in PBS per 1 h a 37 °C: anti-Citokeratina 18 (mouse, Sigma-Aldrich) e anti-Citokeratina 19 (mouse, Exbio) diluiti 1:100, che si legano a specifiche proteine espresse dalle cellule epiteliali; anti-Fibronectina 1 (mouse, Sigma-Aldrich) e anti-Elastina (rabbit, Biorbyt), diluiti 1:200, che riconoscono epitopi di eventuali fibroblasti in coltura. Al termine dell'incubazione, le soluzioni di anticorpi primari sono state eliminate e i vetrini sono stati lavati 3 volte con PBS.

Successivamente, le cellule sono state incubate per 2 h con soluzione di PBS contenente gli anticorpi secondari (anti-mouse, Sigma-Aldrich; anti-rabbit, Invitrogen), coniugati con una molecola fluorescente (TRITC) e diluiti 1:1000, in grado di riconoscere gli anticorpi primari che a loro volta hanno legato le proteine specifiche espresse dalle diverse popolazioni cellulari (epiteliali o fibroblasti). Infine, i vetrini con le cellule aderenti trattate con il DAPI (Cayman Chemical) diluito 1:10000 per permetterne la colorazione nucleica, sono stati montati su vetrini portaoggetti da microscopio per la loro visualizzazione al microscopio a fluorescenza (Eclipse E200, Nikon).

4.RISULTATI

**CONFRONTO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DI GENI IMPLICATI NELLA
STAMINALITÀ TRA CELLULE TUMORALI E CST**

Le tre linee tumorali immortalizzate di adenocarcinoma colo-rettale, **HT29**, **CaCo2** e **HCA7**, sono state coltivate in condizioni aderenti in presenza di siero, per la crescita della linea cellulare tumorale (CT) e in assenza di siero e presenza di fattori di crescita specifici, per la propagazione della linea cellulare staminale tumorale (CST), caratterizzata dalla formazione di aggregati sferici dopo circa 15 giorni.

La staminalità degli aggregati sferici è stata successivamente confermata dalla positività per il marcatore CD44. Sono quindi state rimesse in coltura per essere ulteriormente propagate.

Successivamente, entrambe le popolazioni cellulari sono state caratterizzate dal punto di vista dell'espressione molecolare per evidenziare eventuali tratti distintivi.

È stata quindi confrontata l'espressione di specifici marcatori tumorali nelle CST rispetto alle CT, mediante amplificazione in PCR Real-Time.

In **tabella 1** sono riportati i valori di Fold change e *P* del *t* di Student che indicano la differenza a livello di espressione genica tra le CST e le CT e in rosso sono riportati i valori di *P* significativi ($P < 0.05$).

GENE	HT29		CaCo2		HCA7	
	<i>P value</i>	Fold change	<i>P value</i>	Fold change	<i>P value</i>	Fold change
ABCB5	0.0371	1.99	0.0062	18.02	0.1650	2.49
CD44	0.0501	0.91	0.9688	1.13	0.0005	1.09
TP63	0.0257	11.13	0.0079	13.51	0.0850	24.06
LGR5	0.0367	0.41	0.0826	4.82	1.0000	4.33
MAPK1	0.1548	1.09	0.4670	1.35	0.0040	1.10
NOTCH1	0.0630	2.56	0.0521	3.90	0.1230	0.73
ROCK1	0.5867	1.07	0.1387	1.96	0.0060	0.57
ROCK2	0.3108	0.96	0.2150	1.62	0.0001	1.09
S100A4	0.2582	0.71	0.0480	2.77	0.0020	1.07
SNAI1	0.0759	7.78	0.0284	2.25	0.1090	0.79
TNF α	0.0992	6.92	0.1522	4.54	0.0900	0.69
ALDH	0.0742	3.38	0.1924	1.91	0.0070	8.72

Tab.1 Valori di *P value* e di Fold change del *t* di Student indicanti l'espressione dei geni nelle CST rispetto alle CT nelle tre differenti linee cellulari. In rosso sono indicati i valori statisticamente significativi.

Il **grafico 3** riporta gli ortogrammi ottenuti sulla base dei valori di Fold change evidenziati confrontando la diversa espressione dei geni tra le CST e le CT, nelle HT29, CaCo2 e HCA7.

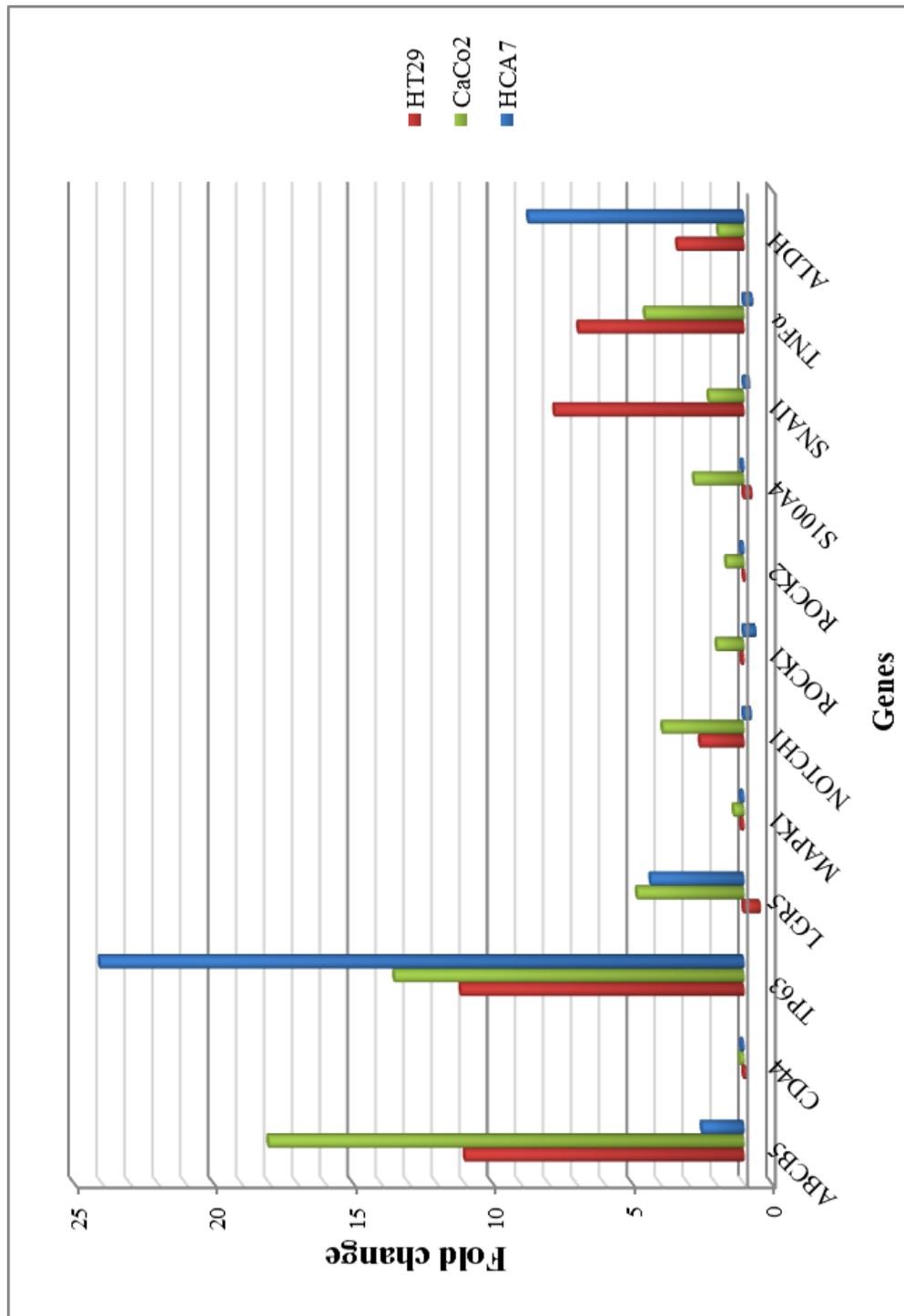


Grafico 3

TRATTAMENTO HCA7 CON *TINOSPORA CORDIFOLIA* ED UN SUO

PRINCIPIO ATTIVO, LA BERBERINA

In seguito all'analisi precedente, ho voluto effettuare una prima indagine sperimentale su una delle tre linee cellulari testate, quali le HCA7. La scelta è stata effettuata su una attenta valutazione riguardante vantaggi costi-benefici e esigenze sperimentali di messa in coltura. Le HCA7 sono state utilizzate per valutare l'eventuale effetto di un trattamento farmacologico potenzialmente anticancro, che prevede l'utilizzo di sostanze naturali medicamentose. Ho optato per l'estratto di *Tinospora cordifolia*, pianta utilizzata nella medicina Ayurvedica e per un suo principio attivo, la berberina (BBR), entrambe gentilmente fornite dal team del Prof. Poli del FABIT, Università di Bologna. Le concentrazioni di utilizzo delle sostanze ed il tempo di trattamento sono stati scelti sulla base del saggio di vitalità cellulare (PrestoBlu™), che ha riportato come la *T. cordifolia* e la BBR inizino ad avere effetto sulla vitalità cellulare a 92.7 µg/ml e 30 µM, rispettivamente, dopo 48 h di trattamento. Tuttavia, il numero di cellule vitali a queste concentrazioni rimane adeguato per poter effettuare una indagine statistica riguardante l'espressione di geni implicati in diversi *pathway* cellulari e poter così studiare gli eventuali effetti biologici del trattamento su cellule ancora vitali e metabolicamente attive. È stato selezionato un pannello di geni sulla base del loro coinvolgimento in attività tipiche delle popolazioni tumorali, quali l'auto-rinnovamento incontrollato, la progressione tumorale, la trasformazione maligna, la mobilità cellulare e l'invasività, la chemio-resistenza e la modulazione dei processi apoptotici, al fine di effettuare uno screening preliminare dell'effetto di tali sostanze sulla popolazione tumorale delle HCA7.

Le **tabelle 2.1 e 2.2** riportano tutti i geni che sono stati indagati nella linea cellulare trattata con estratto di *T. cordifolia* e BBR per 48 h.

La **tabella 3** e il **grafico 4** riportano invece i geni che sono risultati modificare la loro espressione ad un livello statisticamente significativo nell'indagine. In rosso sono riportati i geni sotto-espressi nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate.

In particolare, i geni che hanno manifestato le variazioni più significative e che hanno mostrato un *trend* simile sia per la BBR che la *T. cordifolia* sono: ANAPC2 e CCNA2, coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare; BMP7 e PTP4A1 appartenenti al *pathway* di differenziamento cellulare; CAMK2 e ITGA5 coinvolti nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

Tab.2.1 Geni indagati in PCR Real-Time nelle HCA7, raggruppati per *pathway*

PATHWAY	GENE
Cell cycle	ANAPC2 (anaphase promoting complex subunit 2)
	CCNA2 (cyclin A2)
	CCNB1 (cyclin B1)
	CCNB2 (cyclin B2)
	CCND1 (cyclin D1)
	CCNE1 (cyclin E1)
	CCNT1 (cyclin T1)
	CDK1 (cyclin-dependent kinase 1)
	CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)
	CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)
	CDK6 (cyclin-dependent kinase 6)
	CDC6 (cell division cycle 6)
	CDK4 (cyclin-dependent kinase 4)
	MCM2 (minichromosome maintenance complex component 2)
	WEE1 (WEE1 G2 checkpoint kinase)
SP1 (specificity protein 1)	
Differentiation	AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1)
	BMP2 (bone morphogenetic protein 2)
	BMP7 (bone morphogenetic protein 7)
	DKK-1 (dickkopf-related protein 1)
	EGFR (epidermal growth factor receptor)
	FZD7 (frizzled class receptor 7)
	NOTCH1 (notch 1)
	PTP4A1 (protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1)
	SMAD2 (SMAD family member 2)
	TGFB1 (transforming growth factor beta 1)
	TGFB2 (transforming growth factor beta 2)
	TIMP1 (TIMP metalloproteinase inhibitor 1)
Chemoresistance	ABCB1 (ATP binding cassette subfamily B member 1)
	ABCC1 (ATP binding cassette subfamily C member 1)
	ABCC2 (ATP binding cassette subfamily C member 2)
	ABCC3 (ATP binding cassette subfamily C member 3)
	ABCG2 (ATP binding cassette subfamily G member 2)
	NRF2 (Nuclear factor-like 2)
	SLC39A7 (solute carrier family 39 member 7)

Tab.2.2 Geni indagati in PCR Real-Time nelle HCA7, raggruppati per *pathway*

PATHWAY	GENE
Epithelial-mesenchymal transition	AHNAK (AHNAK nucleoprotein)
	BMP1 (bone morphogenetic protein 1)
	CALD1 (caldesmon 1)
	CaMKIIG (calcium/calmodulin dependent protein kinase II gamma)
	CDH1 (cadherin 1)
	CDH2 (cadherin 2)
	COL1A2 (collagen type I alpha 2)
	CTNNB1 (catenin beta 1)
	DSP (desmoplakin)
	ITGA5 (integrin subunit alpha 5)
	ROCK1 (Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1)
	ROCK2 (Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2)
	SNAI1 (snail family zinc finger 1)
	SNAI2 (snail family zinc finger 2)
	TCF4 (transcription factor 4)
	VCAN (versican)
	VIM (vimentin)
	Cell regulation
ALDH1A1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member A1)	
TP63 (tumor protein p63)	
MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1)	
Apoptosis regulation	BAK1 (Bcl-2 homologous antagonist/killer)
	BAX (Bcl2-associated X protein
	BCL2 (B-cell lymphoma 2)
	BCLXL (B-cell lymphoma-extra large)
	COX-2 (Cyclooxygenase-2)
	FAS (Fatty acid synthase)
	HDAC1 (Histone deacetylase 1)
	HDAC2 (Histone deacetylase 2)
NOTCH2 (notch-2)	

Tab.3 Geni significativamente de-regolati dopo 48 ore di trattamento nelle HCA7

Gene	Berberine 30 μ M		<i>T. cordifolia</i> 92.7 mM		Pathway
	Fold change	<i>P</i> value	Fold change	<i>P</i> value	
ANAPC2	0.3	0.02067	0.32	0.02364	Cell cycle
CCNA2	0.05	0.000002	0.04	0.000001	Cell cycle
BMP2	0.3	0.01406	0.3	0.00994	Differentiation
BMP7	0.55	0.00736	0.22	0.00007	Differentiation
PTP4A1	0.27	0.01967	0.32	0.00115	Differentiation
TGFB1	0.3	0.000005	0.71	0.12505	Differentiation
TSPAN13	0.37	0.00069	0.46	0.0034	Differentiation
CALD1	0.27	0.00476	0.51	0.00697	EMT
CaMKII	0.26	0.00157	0.24	0.00039	EMT
CDH2	1.24	0.28254	0.52	0.03377	EMT
ITGA5	0.18	0.00052	0.14	0.0001	EMT
SNAI2	0.44	0.00791	0.22	0.00043	EMT
TIMP1	0.22	0.00091	0.38	0.00477	EMT

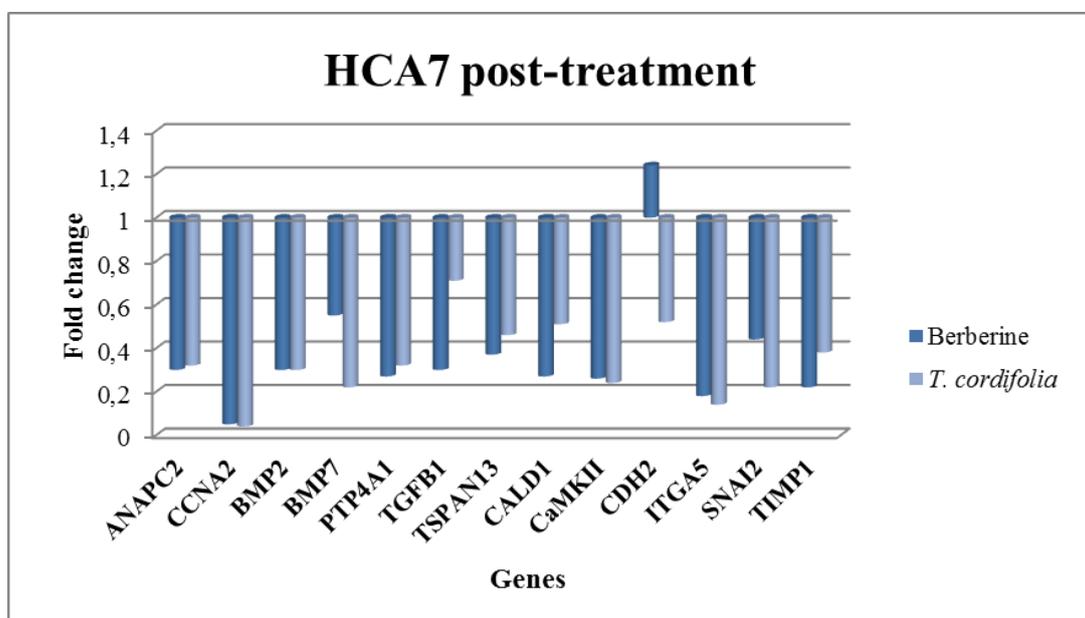


Grafico 4

TRATTAMENTO CON *T. CORDIFOLIA* E BERBERINA DELLE SFERE

OTTENUTE DALLA LINEA HCA7

Alla luce dei risultati preliminari ottenuti dallo studio di espressione genica della linea tumorale delle HCA7, ho valutato l'effetto del trattamento anche sulle sfere di HCA7 e dunque sulla linea staminale tumorale. È stato interessante studiarne l'effetto poiché è risaputo come le cellule staminali tumorali siano le responsabili dello sviluppo del tumore, a seguito dell'alterazione di tutta una serie di *pathway*, descritti in dettaglio nel capitolo introduttivo nel paragrafo "Cellule staminali tumorali". Tra questi, l'inibizione dei processi apoptotici e l'acquisizione di un fenotipo chemio-resistente ricoprono un ruolo cruciale nell'attività delle CST.

A seguito di un attento studio della letteratura, ho deciso di indagare, sulle CST, il comportamento di solo alcuni dei geni studiati invece per la linea tumorale delle HCA7. Ho effettuato la selezione di tali geni sulla base del loro maggior coinvolgimento nei processi che portano ad un fenotipo staminale delle cellule tumorali, come quei geni implicati nella regolazione dell'apoptosi e ciclo cellulare, nella chemio-resistenza e nella transizione epitelio-mesenchimale, tutti tratti distintivi delle CST.

In **tabella 4** sono riportati i geni che hanno subito una de-regolazione significativa in seguito a trattamento. I valori di *P* significativi sono evidenziati in rosso.

Per quanto riguarda i geni implicati nell'**apoptosi**, BAX, BCL-2, BCL-XL, COX-2, FAS, HDAC1 e NOTCH2 sono risultati fortemente sotto-espresi nelle sfere di HCA7 trattate rispetto al controllo. Anche geni che codificano per proteine regolatrici del **ciclo cellulare** sono risultati sotto espressi nelle stesse sfere trattate. Tra questi, CCNB1, CCNB2, Cdk1, Cdk2 e Cdk6. Tra i geni che favoriscono lo sviluppo della **chemio-resistenza** sono risultati de-regolati geni che codificano per proteine trasportatrici di membrana, tra cui quelli della famiglia delle proteine ABC (ABCC1, ABCC2, ABCB1 maggiormente sotto-espresi nelle cellule trattate) ed un membro della famiglia di trasportatori SLC (SLC39A7).

Infine, sono risultati sotto-espresi nelle sfere trattate anche geni che codificano per proteine coinvolte nei processi di EMT, tra cui CDH2, CAMK2 e SNAI2.

Nel **grafico 5**, gli ortogrammi realizzati sulla base dei valori di Fold change sono stati ottenuti confrontando i livelli di espressione dei diversi geni nelle sfere di HCA7 trattate e nel controllo.

Tab.4 Geni significativamente de-regolati dopo 48 ore di trattamento delle sfere ottenute dalla linea HCA7

Gene	Berberine 30 μ M		<i>T. cordifolia</i> 92.7 μ g/ml		Pathway
	Fold change	<i>P</i> value	Fold change	<i>P</i> value	
CCNB1	0.4	0.0006	0.62	0.01	Cell cycle
CCNB2	0.34	0.003	0.53	0.04	Cell cycle
CDK1	0.36	0.008	1.04	0.6	Cell cycle
CDK2	0.45	0.0076	0.69	0.2422	Cell cycle
CDK6	0.51	0.0288	0.4	0.0108	Cell cycle
BAX	0.56	0.0187	0.32	0.0022	Apoptosis
BCL2	0.7	0.0477	0.47	0.0026	Apoptosis
BCLXL	0.36	0.0008	0.26	0.0003	Apoptosis
COX2	0.35	0.007	0.41	0.0157	Apoptosis
FAS	0.33	0.0002	0.64	0.072	Apoptosis
HDAC1	0.42	0.0039	0.33	0.003	Apoptosis
HDAC2	0.5	0.0207	0.56	0.697	Apoptosis
NOTCH2	0.5	0.0208	0.69	0.0038	Apoptosis
ABCB1	0.48	0.0022	1.36	0.0043	Chemioresistance
ABCC1	0.64	0.0035	0.47	0.0001	Chemioresistance
ABCC2	0.68	0.0194	0.37	0.0002	Chemioresistance
SLC39A7	0.49	0.0057	0.59	0.0228	Chemioresistance
CAMK2	1.36	0.1984	0.35	0.0019	EMT
CDH2	1.33	0.3557	0.42	0.0198	EMT
SNAI2	1.06	0.7792	0.56	0.0179	EMT

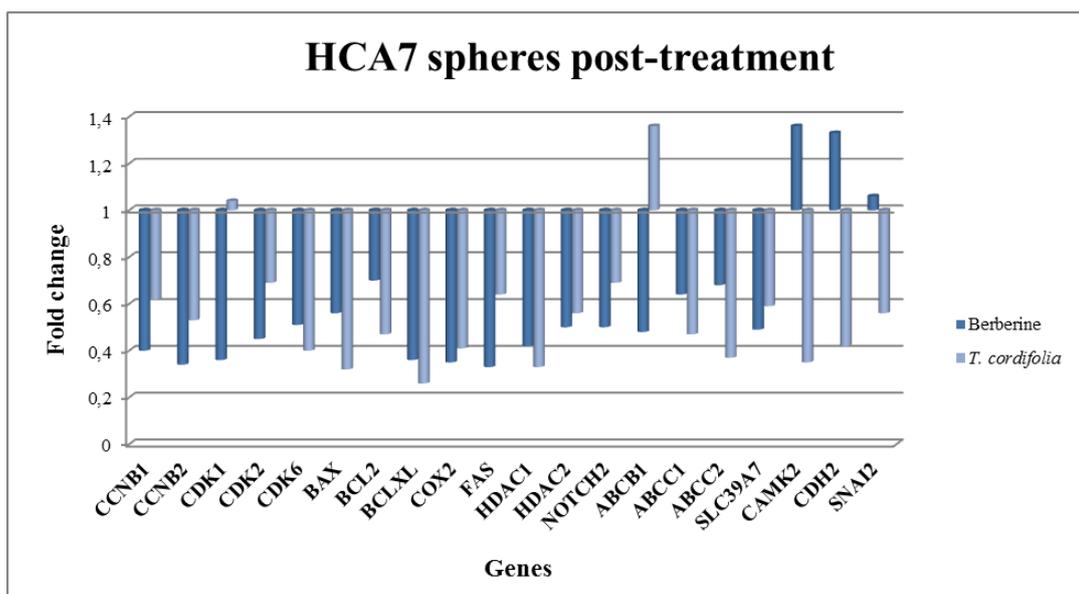


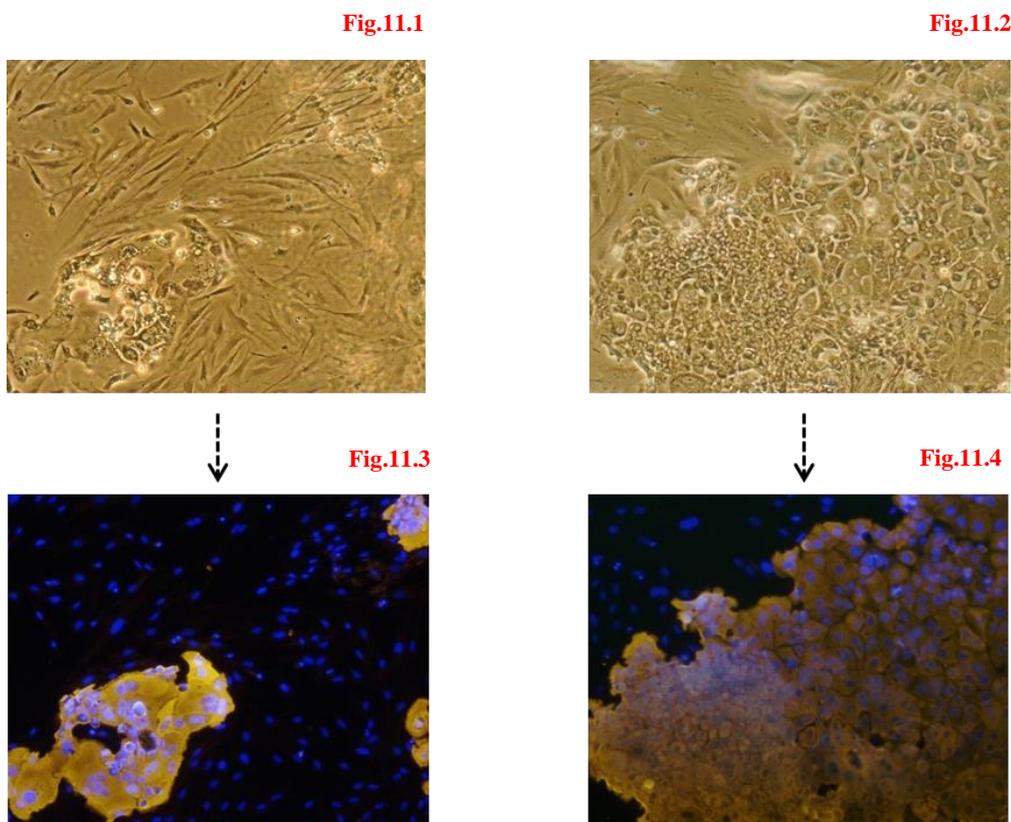
Grafico 5

**MESSA IN COLTURA DI BIOPSIA DA PAZIENTE AFFETTO DA CARCINOMA
DEL COLON-RETTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE POPOLAZIONI
CELLULARI CON SAGGIO DI IMMUNOFLUORESCENZA**

In concomitanza agli studi condotti su linee tumorali immortalizzate, ho raccolto materiale biotico proveniente da tessuto tumorale e sano di pazienti affetti da carcinoma del colon-retto. La messa in coltura e l'isolamento di cellule epiteliali da biopsia non si è rivelata assolutamente di facile esecuzione, ma dopo diverse prove, utilizzando metodi di estrazione e procedure sperimentali di messa in coltura differenti, ho ottenuto delle condizioni soddisfacenti.

Le popolazioni cellulari ottenute dalle biopsie tumorali sono state caratterizzate attraverso saggi di immunofluorescenza, utilizzando due anticorpi che si legano alle cheratine come CK-18 e CK-19. Il DAPI è stato utilizzato per la messa in evidenza dei nuclei. Le cellule isolate dalle biopsie tumorali, fornite dall'Anatomia Patologica e classificate come carcinoma colo-rettale, sono risultate positive per l'espressione di Citocheratina-18 (CK-18) e Citocheratina-19 (CK-19), marcatori tipici delle cellule epiteliali, mentre i fibroblasti sono risultati negativi per gli stessi anticorpi.

Di seguito, le immagini al microscopio a fluorescenza (Eclipse E200, Nikon) delle biopsie tumorali messe in coltura (**Fig.11.1-11.4**)



In Fig.11.1 e Fig.11.2 immagini ottenute con luce bianca. In Fig.11.3 e Fig.11.4 immagini ottenute utilizzando la fluorescenza: in blu si evidenziano i nuclei delle cellule, sia epiteliali che fibroblasti, mentre in giallo abbiamo le cellule epiteliali positive alla CK-18.

5.DISCUSSIONE

CONFRONTO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DI GENI IMPLICATI NELLA STAMINALITÀ TRA CELLULE TUMORALI E CST

Come modello di studio *in vitro* sono state utilizzate tre linee cellulari immortalizzate provenienti da tumori al colon-retto: **HT29**, **CaCo2** e **HCA7**.

Tali linee, come altre provenienti da differenti tipi di tumore, se poste in condizioni particolari, sono in grado di dare origine ad una sottopopolazione di cellule staminali tumorali (CST), che si aggregano a formare delle sfere.

L'interesse verso questa sottopopolazione cellulare tumorale nasce da uno studio approfondito della letteratura, che riporta come esistano ormai numerose evidenze sperimentali che supportano l'ipotesi della presenza di CST in grado di innescare e alimentare lo sviluppo di diversi tipi di tumore, compreso quello al colon-retto [113,114].

Prima di svolgere l'indagine sperimentale, è stata selezionata una serie di geni potenzialmente coinvolti nell'insorgenza e progressione tumorale del colon-retto, al fine di confrontare la loro espressione nelle cellule staminali tumorali rispetto alla controparte tumorale.

Le tre linee tumorali hanno messo in evidenza un profilo d'espressione genica comune, suggerendo un possibile coinvolgimento delle staminali tumorali nell'insorgenza e progressione del tumore.

In particolare, la proteina di trasporto prodotta dal gene **ABCB5**, l'enzima **ALDH1A1** e la proteina di adesione cellulare **CD44** [160,190,217], identificati come marcatori molecolari delle CST, sono risultati sovra-espressi nelle CST isolate dalle tre linee cellulari, anche se in una diversa proporzione.

Anche altri geni associati alla progressione tumorale e ad una prognosi avversa sono risultati essere sovra-espressi in tutte e tre le linee cellulari testate. Tra questi sono stati analizzati: il **TNF α** , un potente mutageno del DNA la cui sovra-espressione aumenta le caratteristiche tumorigeniche delle CST attraverso l'attivazione di **NOTCH1**, che risulta anch'esso essere sovra-espresso nell'indagine sperimentale effettuata [123,218]; **TP63**, associato ad un aumento della trasformazione maligna del tumore e ad una ridotta prognosi [219]; **SNAI1** coinvolto nella transizione epitelio-mesenchimale, processo di fondamentale importanza per l'invasività tumorale e la formazione di metastasi [220,221].

LGR5 è risultato essere sovra-espresso maggiormente nelle CST delle linee CaCo2 e HCA7, ad avvallare altri studi sul coinvolgimento del suo prodotto nell'identificazione di CST [194].

LGR5 è un gene appartenente al *pathway* di Wnt, che risulta fortemente deregolata nella popolazione di cellule staminali tumorali. Pertanto, un'approfondita comprensione delle alterazioni molecolari alla base della tumorigenesi del CCR diventa cruciale per l'identificazione di eventuali bersagli molecolari, utili per provare ad adattare gli interventi terapeutici in maniera potenzialmente selettiva [222].

TRATTAMENTO HCA7 CON *T. CORDIFOLIA* E BERBERINA

Come riportato in precedenza, negli ultimi anni, molta attenzione è stata dedicata allo studio del possibile ruolo anti-tumorale di alcune sostanze naturali come ad esempio l'estratto di *Tinospora cordifolia* e un suo principio attivo, la berberina (BBR) [73,93].

Inizialmente, ho valutato l'effetto dell'estratto di *T. cordifolia* e BBR sulla popolazione tumorale delle HCA7. Le concentrazioni di utilizzo delle sostanze e le tempistiche del trattamento sono state scelte previo saggio di vitalità cellulare con il reagente PrestoBlu™. Dopo 48 h di trattamento con 92.7 µg/ml di *T. cordifolia* (calcolati corrispondere a 30 µM di berberina presente) e 30 µM di BBR pura, si evidenzia una significativa modulazione dell'espressione genica delle HCA7 senza tuttavia ridurre drasticamente la percentuale di cellule vitali.

Diversi studi suggeriscono che il potenziale anti-tumorale di molte sostanze risiede nella loro capacità di indurre la morte delle cellule tumorali attraverso diversi meccanismi, tra cui spiccano maggiormente quelli implicati nell'attivazione di *pathway* apoptotici e l'inibizione dei processi di proliferazione e invasività cellulare. Evidenze sperimentali riportano come molte di tali sostanze agiscono su diverse proteine coinvolte nei processi del ciclo cellulare, inducendo molto spesso l'arresto in fase G2/M⁵ che, se prolungato, porta alla morte cellulare per apoptosi [139]. Altri studi riportano dati circa il loro ruolo di tali sostanze nel modulare l'attività di proteine coinvolte nell'acquisizione di un fenotipo migratorio da parte delle cellule, inibendo così le fasi iniziali dei processi metastatici [223]. Lo screening preliminare da me condotto potrebbe fornire un'idea indicativa sull'eventuale effetto del trattamento e se eventualmente estendere lo studio ad altri possibili *pathway* cellulari a cui tali geni prendono parte, identificando ulteriori potenziali target terapeutici. Tra i geni che sono risultati essere modulati dal trattamento, a livello di espressione, ve ne sono due implicati nella regolazione del ciclo cellulare che sono risultati significativamente sotto-espressi: **ANAPC2** e **CCNA2**.

⁵ Fase G2/M= fase del ciclo cellulare in cui la cellula si prepara ad andare in Mitosi

Il primo codifica per una proteina facente parte di un complesso multiproteico chiamato anaphase-promoting complex (APC) che promuove la transizione dalla metafase all'anafase. Studi recenti hanno evidenziato che un estratto di curcumina, proveniente dal rizoma di *Curcuma longa*, mostra proprietà chemio-preventive e chemio-terapiche inducendo la morte delle cellule tumorali attraverso l'attivazione dell'apoptosi e l'inibizione della crescita e proliferazione cellulare. La curcumina riesce ad interagire con ANAPC2, causando un arresto in fase G2/M del ciclo cellulare [224]. Nonostante l'obiettivo non sia quello di causare necrosi/morte cellulare a seguito del trattamento con l'estratto di *T. cordifolia*, potrebbe essere comunque interessante valutarne l'effetto in termini di modulazione genica. Il gene CCNA2, invece, codifica per una proteina che appartiene alla famiglia altamente conservata delle cicline, i cui componenti sono cruciali nel ciclo cellulare. Le cicline funzionano come regolatori delle chinasi Cdk, contribuendo al coordinamento temporale di ogni evento mitotico.

In particolar modo, CCNA2 lega la Cdk2 promuovendo così il passaggio sia dalla fase G1 alla fase S, che dalla fase G2 alla fase M. In letteratura è stato riportato come l'espressione di questa proteina aumenti durante la tumorigenesi [225].

Un altro evento tumorale di estrema importanza è l'acquisizione di un fenotipo migratorio da parte delle cellule epiteliali tumorali, che viene considerato uno *step* fondamentale per l'inizio dei processi metastatici. Così, nella mia analisi ho voluto testare una serie di geni coinvolti in questi processi e alcuni di esse sono risultati sotto-espressi nelle HCA7 in seguito a trattamento con *T. cordifolia* e BBR: **BMP2**, **BMP7**, **CDH2**, **TGFβ1**, **ITGA5**, **SNAI2**, **TIMP1**, **PTP4A1**, **TSPAN13**.

BMP2 e BMP7 fanno parte della famiglia delle proteine BMP, le quali sono fortemente coinvolte nella carcinogenesi e nell'aumento dell'aggressività tumorale [226,227]. CDH2, TGFβ1, ITGA5 e SNAI2 sono geni che codificano per proteine coinvolte nella motilità cellulare, in quanto il primo produce una proteina di adesione cellulare, detta anche N-caderina, la cui funzione è importante durante la gastrulazione. Le cellule epiteliali quando vanno incontro a EMT sono sottoposte ad una conversione fenotipica, in cui viene diminuita l'espressione a livello della membrana plasmatica o nella sua prossimità, di alcune proteine responsabili dell'adesione tra cellule e tra cellula e substrato, tra cui l'E-caderina, e viene aumentata l'espressione di N-caderina.

L'espressione di N-caderina è anche fortemente collegata alla presenza di TGFβ1, anch'esso sovra-espresso nelle cellule tumorali, che porta ad un aumento della migrazione e invasione cellulare [228].

ITGA5 codifica per una integrina di membrana che ha la funzione recettoriale di legare la fibronectina della matrice extracellulare e modula numerose vie del segnale implicate nella proliferazione, migrazione, invasione e differenziazione. L'alterata espressione di questa integrina è stata dimostrata in molti studi realizzati anche su linee cellulari immortalizzate di carcinoma del colon [229].

SNAI2 agisce come repressore della trascrizione di alcune proteine tra cui l'E-caderina ed è dunque coinvolta nella transizione epitelio-mesenchimale, ma anche nello sviluppo di un fenotipo chemio-resistente da parte delle cellule tumorali [230,231].

TRATTAMENTO CON *T. CORDIFOLIA* E BERBERINA DELLE SFERE

OTTENUTE DALLA LINEA HCA7

Dall'analisi del profilo di espressione genica della linea tumorale di HCA7 trattata con *T. cordifolia* e BBR si evince che non tutti i geni testati risultano essere significativamente modulati. Così, a seguito di un attento screening della letteratura e dal principio secondo il quale le CST sono le responsabili dell'insorgenza del tumore, ho condotto uno studio dell'espressione genica sulle **sfere** ottenute da HCA7, focalizzando l'attenzione su diverse vie di segnalazione che regolano: l'**apoptosi** e il **ciclo cellulare**; la **transizione epitelio-mesenchimale**, il fenomeno della **chemio-resistenza**.

I risultati più promettenti sono stati ottenuti per geni che codificano proteine che regolano l'apoptosi, come BAX, FAS, NOTCH2, BCL-2 e BCL-XL, che sono risultati significativamente sotto-espressi nella mia analisi. Inoltre, vi sono dei geni che producono proteine coinvolte in maniera indiretta nei processi apoptotici, come ad esempio COX-2 che prende parte ad una cascata di eventi che va a regolare negativamente una proteina pro-apoptotica (BAD). Molto spesso, COX-2 è stata trovata sovra-espressa in molti tipi di tumore compreso quello del colon [232], evitando così alla cellula di entrare in apoptosi [233]. Uno studio del 2009 condotto sulle HT29, ha evidenziato come l'utilizzo di un flavonolo contenuto nella frutta e verdura, la fisetina, riesca a modulare l'espressione di COX-2, supportando la tesi che lo vede come probabile target terapeutico per il trattamento del carcinoma colo-rettale [234].

Inoltre, enzimi della classe HDAC (histone deacetylase), che regolano l'espressione genica modulando la conformazione degli istoni, sono stati trovati over-espressi nelle cellule tumorali del colon nelle prime fasi della carcinogenesi [235].

Sono stati, dunque, valutati i livelli di espressione di HDAC1 e HDAC2 nelle sfere trattate, ed effettivamente sono risultati essere sotto-espressi rispetto ai livelli di espressione nelle sfere non sottoposte a trattamento.

Altri risultati promettenti sono stati ottenuti dall'analisi di geni coinvolti nello sviluppo della chemio-resistenza da parte delle cellule staminali tumorali, peculiarità che si manifesta nel fenotipo più aggressivo e resistente. L'attenzione è stata focalizzata principalmente su trasportatori di membrana, che si sa essere altamente espressi nelle CST [148,150,236,237]. In seguito al trattamento, i geni risultati maggiormente sotto-espressi tra quelli analizzati sono: ABCC1, ABCC2, ABCB1 e SLC39A7. Molto spesso le proteine di diverse vie di segnalazione risultano essere sovra-espresse contemporaneamente, nelle cellule tumorali.

Ad esempio, Ye e colleghi hanno trovato alti livelli di espressione sia di ABCB1 che HDAC2 in pazienti affetti da CRC, causando resistenza ad uno dei principali chemioterapici, la doxorubicina. È stato visto come HDAC2 vada a legarsi al promotore di ABCB1, favorendone l'attivazione e dunque un aumento della sua trascrizione [238].

Nella mia sperimentazione, le CST isolate dalle sfere di HCA7 e trattate con *T. cordifolia* e BBR esprimono livelli inferiori all'atteso, sia di ABCB1 che HDAC2. I livelli di espressione di SLC39A7 sembrano invece correlati a quelli di BCL-2, coinvolto nell'apoptosi, entrambi i geni risultano infatti fortemente sotto-espressi nelle sfere trattate. SLC39A7 è una proteina trasportatrice di membrana coinvolta nel trasporto facilitato e trasporto attivo secondario di soluti, tra cui anche i farmaci. Fisiologicamente, SLC39A7 è coinvolto nell'omeostasi tissutale dell'epitelio intestinale, agendo sulla replicazione di cellule progenitrici e cellule staminali normali [237]. Tuttavia, alcuni studi mostrano come questo trasportatore sia over-espresso nei tessuti tumorali del colon rispetto alla mucosa sana ma, se silenziato, provoca un arresto del ciclo cellulare in fase G2/M, causato anche da una diminuzione dell'espressione di BCL-2. Sia SLC39A7 che BCL-2 risultano essere sotto-espressi nel mio modello di studio [239].

MESSA IN CULTURA DI BIOPSIA DA PAZIENTE AFFETTO DA CARCINOMA DEL COLON-RETTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE POPOLAZIONI CELLULARI CON SAGGIO DI IMMUNOFLUORESCENZA

In concomitanza agli studi condotti su linee tumorali immortalizzate, ho raccolto materiale biotipico proveniente da tessuto tumorale e da mucosa sana di pazienti affetti da carcinoma del colon-retto, previa approvazione da parte del Comitato Etico.

Lo scopo era quello di replicare gli esperimenti, condotti in precedenza sulle HCA7, sulle colture primarie delle cellule derivanti dai tessuti tumorali e sani del colon. Tuttavia, la messa in coltura e l'isolamento di tali cellule non si è rivelata di facile esecuzione, data

dalla scarsa attività replicativa delle cellule epiteliali e dalla difficoltà a mantenerle in coltura a causa della loro scarsa vitalità.

È ormai dimostrato che le cellule epiteliali dello strato superficiale della mucosa sono cellule differenziate, con una vita breve e che, se messe in coltura, vanno incontro ad un naturale processo di apoptosi (anikosis).

Tuttavia, l'epitelio intestinale è provvisto di una popolazione cellulare eterogenea alla base delle cripte intestinali, costituita principalmente da cellule proliferanti in fase di differenziamento frammiste a scarse cellule staminali che provvedono alla fisiologica rigenerazione cellulare del tessuto stesso.

Dunque, questa parte del piano sperimentale della tesi di dottorato si è rivelata molto ostica e di difficile riproduzione per una serie di cause, tra cui del materiale biotico di partenza in quantità non adeguata, spesso contaminato e di scarsità numerica. Dopo svariati tentativi di estrazione e di messa in coltura differenti, ho individuato le condizioni adatte al materiale biologico a mia disposizione.

Una di queste condizioni si è rivelata la co-presenza dei fibroblasti in coltura, i quali sembrano aver ricreato il giusto microambiente per le cellule tumorali per potersi replicare. Inoltre, le cellule epiteliali tumorali che erano circondate dai fibroblasti, dopo 2-3 giorni di crescita iniziavano a formare delle strutture tridimensionali, simile ai tumoroidi (ossia colture 3D che si formano a seguito di opportune condizioni e che si pensa possono essere un vantaggio rispetto a quelle 2D).

Una volta ottenuta la co-coltura di cellule tumorali e fibroblasti, le diverse popolazioni sono state caratterizzate mediante saggi di immunofluorescenza, che hanno rivelato come le cellule tumorali siano positive per la CK-18 e CK-19, marcatori tipici delle cellule epiteliali. Per contro, i fibroblasti sono risultati negativi per gli stessi anticorpi, ma positivi per FN1 (dati non riportati). La scarsa replicazione cellulare rimane sempre un limite da dover superare, poiché le cellule isolate dalle biopsie non riescono a rimanere in coltura per più di 7 giorni circa. Questo potrebbe essere un punto critico per eventuali studi sperimentali successivi, come ad esempio la valutazione dell'effetto di un trattamento.

**6.PERIODO ALL'ESTERO
NELL'AMBITO DEL
PROGRAMMA MARCO POLO**

**PERIODO FORMATIVO PRESSO IL CRCM DI MARSIGLIA: ISOLAMENTO DI
ORGANOIDI DA BIOPSIE TUMORALI E LINEE CELLULARI
IMMORTALIZZATE E LORO CO-COLTURA CON FIBROBLASTI ASSOCIATI
AL TUMORE**

Alla luce delle criticità riscontrate sulla messa in coltura delle cellule isolate dal materiale biologico tumorale e sano a mia disposizione, ho contattato un centro di ricerca oncologico a Marsiglia, il Centre de Recherche en Cancerologie de Marseille (CRCM), sulla base dei loro studi condotti su CST e modelli sperimentali 3D, quali gli **organoidi**. Mi è stata data la possibilità di svolgere un periodo di formazione estera, nell'ambito del Programma Marco Polo, della durata di 4 mesi presso i laboratori del CRCM, sotto la supervisione delle Dott.sse Emilie Mamessier e Claire Acquaviva.

Durante il mio stage, ho lavorato sulla generazione di una bio-banca di organoidi derivati da biopsie tumorali di carcinoma della mammella e carcinoma del colon-retto. Gli organoidi sono colture *in vitro* tridimensionali derivate da aggregazioni cellulari isolate da tessuti primari o cellule staminali, che hanno la capacità di auto-rinnovarsi, ri-organizzarsi e comportarsi in maniera simile agli organi da cui derivano [240].

I modelli sperimentali che prevedono l'utilizzo di organoidi potrebbero andare a rivestire un ruolo fondamentale per studi di diverse patologie, biologia dello sviluppo, meccanismi rigenerativi, farmaco-tossicità e medicina preventiva [241-246].

Le colture 3D presentano dei vantaggi rispetto alle colture 2D, in quanto queste ultime non sempre si rivelano aderenti alla situazione *in vivo*, dato che manca tutta l'architettura tridimensionale dell'organo o tessuto di derivazione. Inoltre, i modelli 3D sembrano vantaggiosi anche rispetto alla sperimentazione animale, come i PDX (patient-derived xenograft), che molto spesso si rivelano costosi, laboriosi, poco efficienti e con tempistiche di sviluppo molto lunghe [247]. Un altro vantaggio è quello di riuscire a mantenerle molto più a lungo in coltura, rispetto a quelle 2D, dando quindi la possibilità al ricercatore di gestire meglio le tempistiche della sperimentazione, grazie alla presenza di molteplici fattori addizionali nel terreno di crescita che preservano tutte le caratteristiche di staminalità [248]. Le colture 3D rappresentano quindi un modello sperimentale decisamente più pertinente rispetto agli altri tipi di colture cellulari, in quanto risultano più rappresentative dell'architettura e dell'organizzazione reale dell'organo da cui derivano [249].

Gli organoidi possono anche essere crio-preservati, nell'ambito di una bio-banca, garantendo la possibilità di rimetterli in coltura ed espanderli in maniera indefinita, grazie alla loro capacità di ri-organizzarsi, auto-rinnovarsi e di dare luogo anche a cellule più differenziate [242,245,246].

Durante la prima parte del mio stage, mi sono dedicata alla messa a punto di un protocollo che prevedesse le condizioni di isolamento, crescita e riproduzione cellulare ideali.

Le colture di **organoidi** sono state isolate da biopsie tumorali di carcinoma della mammella (figura 12.1 e figura 12.2), ma anche da una linea cellulare immortalizzata di adenocarcinoma del colon-retto, quale le HCT116, che per la morfologia che acquisiscono in coltura vengono anche definiti *Micro Tissue* (MT).

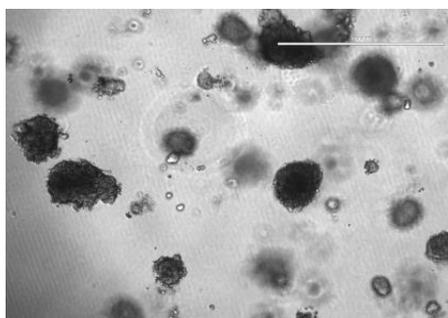


Fig.12.1

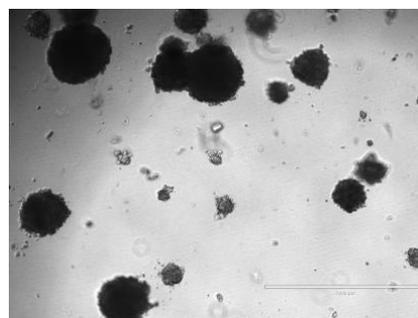


Fig.12.2

Successivamente, ho lavorato su questi stessi organoidi nell'ambito di un piccolo progetto di co-coltura, inizialmente con i fibroblasti associati al tumore o CAF (*cancer-associated fibroblasts*) e in seguito con cellule endoteliali. Lo scopo era di provare a ricreare *in vitro* un microambiente tale da preservare l'architettura tissutale di origine, per provare ad avvicinarsi il più possibile alla realtà in termini di arrangiamento spaziale, interazioni e composizioni cellulari.

Il **microambiente tumorale** ha la funzione di sostenere le popolazioni cellulari neoplastiche ed è composto da una matrice extracellulare (con prevalenza di collagene I, collagene IV e fibronectina), da cellule stromali e da cellule endoteliali che tendono a formare nuovi vasi sanguigni nel comparto tumorale. Durante la **tumorigenesi**, le cellule dello stroma (CAF, cellule immunitarie, cellule adipose) sono fortemente coinvolte nel rimodellamento della matrice, caratterizzato da una forte desmoplasia⁶ e una forte immunosoppressione.

⁶ **Desmoplasia** : Processo di formazione di tessuto fibroso (<http://www.abcsalute.it/dizionario-medico/desmoplasia.html>).

La formazione di nuovi vasi sanguigni, detta **angiogenesi**, è di fondamentale importanza, in quanto garantisce l'apporto di tutti i nutrienti necessari al tumore per potersi sviluppare e contribuisce alla sua invasività in distretti secondari e alla formazione di metastasi [250].

Inizialmente, ho effettuato diverse prove per ottenere le condizioni migliori di crescita della co-coltura, utilizzando i CAF-142 (linea di CAF isolata da adenocarcinoma pancreatico) e organoidi/MT derivanti da biopsie di carcinoma del seno e dalla linea cellulare HCT116.

A seguito di vari esperimenti due condizioni sono risultate essere ottimali per la crescita.

La prima prevede l'utilizzo di un supporto tridimensionale per la crescita cellulare, chiamato Matrigel, ossia una soluzione commerciale contenente proteine della matrice extracellulare e fattori di crescita, che a 37 °C gelifica.

In questa condizione sperimentale, CAF-142 e organoidi/MT devono essere seminati contemporaneamente in Matrigel per favorirne la corretta interazione (**Fig.13**).

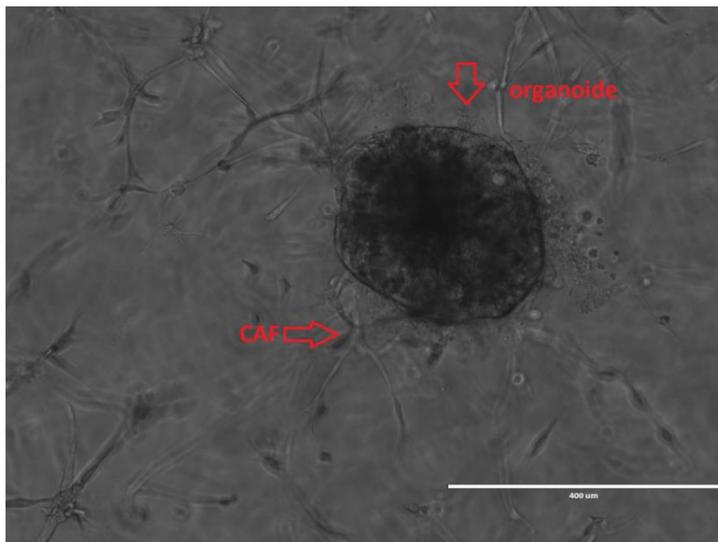


Fig.13

Co-coltura organoide+CAF-142 in Matrigel. I fibroblasti all'interno del Matrigel si dispongono in una rete tridimensionale che cerca di prendere contatto con le cellule tumorali, circondandole e supportandone la crescita.

La seconda condizione prevede l'utilizzo di uno strato di fibroblasti aderenti alla base del pozzetto. Inizialmente, sono stati seminati solo i CAF-142 per permettere la loro adesione e dopo circa 4-5 giorni sono stati aggiunti gli organoidi oppure i MT.

Le cellule sono rimaste in coltura per altri 4-5 giorni per permette l'interazione tra i diversi citotipi (**Fig.14**).

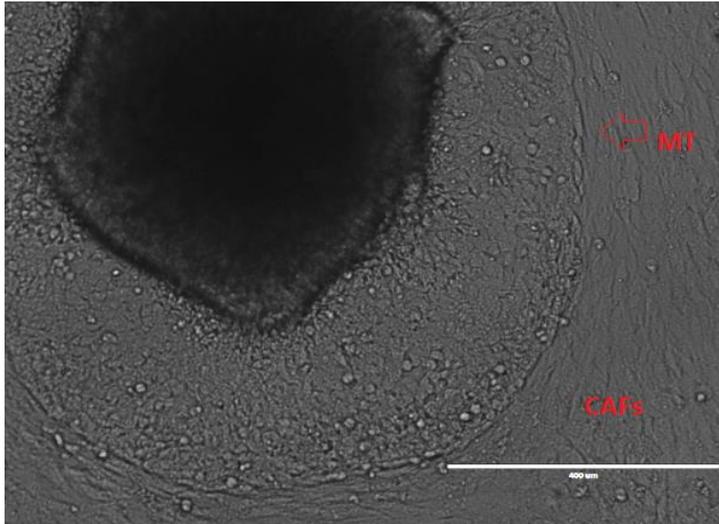


Fig.14

Co-coltura MT+CAF-142. Il MT è stato aggiunto in coltura dopo 4-5 giorni dalla semina dei fibroblasti per permettere la formazione di un layer che funge da supporto alle cellule tumorali. Il MT è formato da un core necrotico (in nero) e da cellule tumorali che si dipartono da esso e lo circondano. Si evidenzia molto bene il confine che separa il MT dai fibroblasti.

Successivamente, la co-coltura è stata caratterizzata attraverso saggi di immunofluorescenza utilizzando anticorpi specifici per la popolazione tumorale epiteliale e per la popolazione di CAF.

In entrambe le condizioni di co-coltura, i CAF-142 sono risultati positivi ad α -SMA (alpha-smooth muscle actin) (in giallo) e vimentina (in viola), mentre le cellule tumorali provenienti da organoidi o MT sono risultati positivi alla pan-CTK (in verde). Il DAPI (in blu) è stato utilizzato per la messa in evidenza dei nuclei (Figg.15-16-17). Ho potuto appurare come i fibroblasti che circondano le cellule tumorali e che entrano in contatto diretto con loro esprimono un elevato livello di espressione di α -SMA, rispetto a quelli che si trovano distanti, che invece esprimono alti livelli di vimentina. α -SMA è una proteina che prende parte alla formazione degli apparati cito-scheletrici, coinvolta nella motilità e nella integrità cellulare. Ohlund e colleghi hanno ottenuto gli stessi risultati su organoidi isolati da biopsie di adenocarcinoma del pancreas [251]. La positività rilevata per α -SMA ha confermato che i fibroblasti delle mie co-culture erano attivati. L'attivazione dei CAF avviene in prossimità del tumore, nel momento in cui i fibroblasti interagiscono con le cellule tumorali.

Di conseguenza, una volta che i CAF vengono attivati, secernono dei fattori che promuovono la crescita tumorale, la sopravvivenza cellulare e la formazione di metastasi [252-255].

Fig.15

Saggio di immunofluorescenza di co-coltura organoide+CAF-142, dopo 4-5 giorni dalla semina in Matrigel. I CAF in prossimità delle cellule tumorali esprimono alti livelli di α -SMA (in giallo), mentre quelli più distanti esprimono alti livelli di vimentina (in viola). Le cellule tumorali degli organoidi risultano positive alla pan-CTK (in verde), tipicamente espressa dalle cellule epiteliali. In blu i nuclei, positivi per il DAPI.

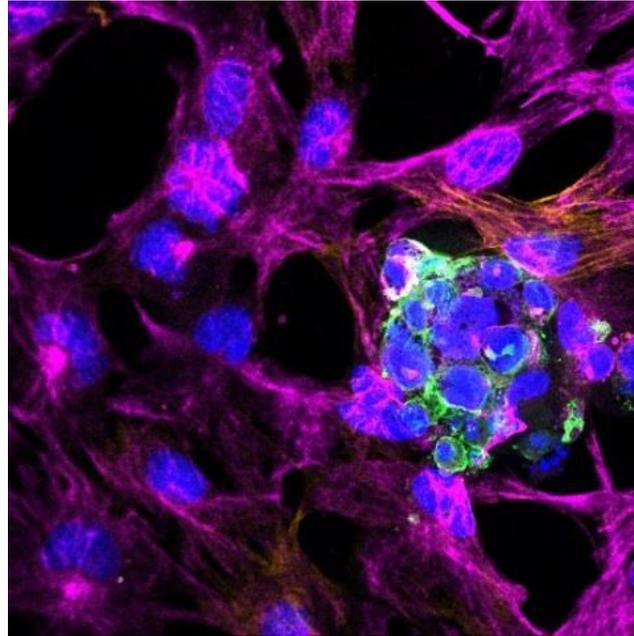


Fig.16

Saggio di immunofluorescenza dopo 4-5 giorni di co-coltura MT+CAF-142 in assenza di Matrigel. Il MT, aggiunto in coltura dopo 4-5 giorni dalla semina dei fibroblasti è positivo alla pan-CTK (in verde). I CAF in prossimità delle cellule tumorali esprimono alti livelli di α -SMA (in giallo), mentre quelli più distanti esprimono alti livelli di vimentina (in viola). In blu i nuclei, positivi per il DAPI.

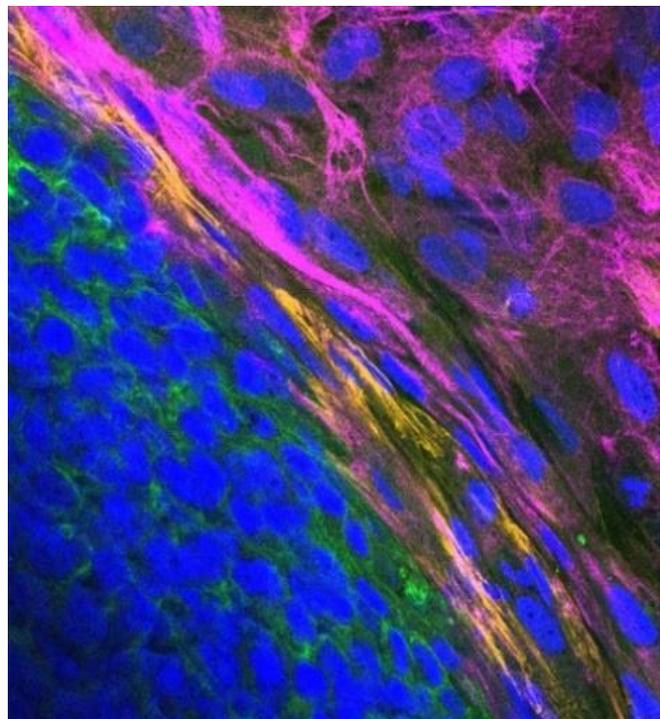




Fig.17

Co-coltura organoidi+CAF-142 senza Matrigel. Le cellule tumorali degli organoidi sono positive per la pan-CTK A488 (in verde). I CAF in prossimità delle cellule tumorali esprimono alti livelli di α -SMA (in giallo), mentre quelli più distanti esprimono alti livelli di vimentina (in viola). In blu i nuclei, positivi per il DAPI.

Infine, la co-coltura con le cellule endoteliali (dati non riportati) non ha fornito i risultati sperati, nonostante le diverse condizioni testate, in quanto i parametri da valutare ed i test da effettuare sono molteplici e dunque richiedeva un tempo più lungo rispetto a quello a disposizione.

**7.CONCLUSIONI
&
PROSPETTIVE FUTURE**

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni, molti studiosi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo delle cellule staminali tumorali come responsabili dell'insorgenza del tumore e della formazione di metastasi. Questa tipologia di cellule presenta delle caratteristiche peculiari tali per cui esse possono essere definite come "cellule iniziatrici del cancro". Tra queste caratteristiche, due sembrano svolgere un ruolo cruciale: da una parte, la loro capacità di evadere dai normali processi di apoptosi e, dall'altra, di essere particolarmente chemio-resistenti.

Le alterazioni a carico dei principali *pathway* chiave, coinvolti nello sviluppo di un fenotipo staminale tumorale e la conoscenza delle alterazioni molecolari che la sostengono, diventano quindi cruciali per consentire l'identificazione di potenziali bersagli molecolari per interventi terapeutici selettivi contro questa sottopopolazione tumorale.

Lo studio che ho svolto nell'ambito del progetto di dottorato ha evidenziato come l'estratto di *T. cordifolia* ed uno dei suoi principi attivi, la **berberina**, svolgano un'azione efficace nel modulare l'espressione di un panel di geni sottoposti ad indagine. A seguito di un meticoloso *screening* della letteratura, ho scelto di indagare specifici geni, scelti sulla base del loro coinvolgimento in meccanismi tipici delle popolazioni tumorali, quali auto-rinnovamento incontrollato, invasività e motilità cellulare, sviluppo e progressione tumorale, trasformazione maligna.

Le indagini condotte sulle popolazioni tumorale e staminale tumorale della linea **HCA7** di adenocarcinoma colon-rettale, mi hanno fornito indicazioni incoraggianti riguardo un potenziale ruolo antitumorale dell'estratto della pianta medicamentosa scelta per il trattamento e di un suo principio attivo in particolare. Le principali modulazioni geniche, a seguito del trattamento, si sono verificate a carico di geni coinvolti nella **transizione epitelio-mesenchimale**, di geni che codificano proteine del **ciclo cellulare**, di geni implicati nello sviluppo di un fenotipo **chemio-resistente** e di geni che codificano per proteine **anti-apoptotiche**. L'espressione di questi geni si è rivelata fortemente sotto-espressa nelle popolazioni cellulari trattate rispetto alle medesime non trattate, a dimostrazione del fatto che i trattamenti impiegati possano effettivamente svolgere un'azione inibente nei confronti delle vie metaboliche tipiche delle popolazioni cellulari tumorali.

PROSPETTIVE FUTURE

I risultati incoraggianti ottenuti dallo studio svolto durante il dottorato, aprono prospettive future sull'eventuale utilizzo di sostanze naturali ad azione medicamentosa.

Durante il mio percorso di dottorato, ho avuto anche modo di lavorare ad un progetto parallelo a quello presentato nel presente elaborato di tesi, prendendo in esame un altro modello cellulare, quale il carcinoma alla laringe, anch'esso di derivazione epiteliale come il carcinoma al colon-retto.

L'idea che ho avuto è stata quella di sensibilizzare le Hep2, una linea cellulare immortalizzata del carcinoma alla laringe, all'effetto del cisplatino e del 5-fluoracile (5-FU), due dei farmaci d'elezione per il trattamento di questa neoplasia. Tuttavia, è noto come questi due trattamenti molto spesso causino chemio-resistenza e ciò rappresenta una delle maggiori criticità in campo oncologico.

La sensibilizzazione della linea Hep2 è stata effettuata grazie ad un pre-trattamento di 4 h con la berberina, in seguito al quale sono state trattate con 5-FU e cisplatino. Tale approccio ha rivelato come la BBR abbia potenziato gli effetti dei due chemio-terapici, i quali, se utilizzati da soli non avevano effetti né sulla vitalità cellulare (95-98%) né sulla modulazione dei livelli di espressione di geni particolarmente coinvolti nella progressione del tumore alla laringe [256].

Sarebbe interessante riuscire a replicare in futuro l'approccio sperimentale adottato per la linea Hep2 al carcinoma del colon-retto, sottoponendo le sottopopolazioni cellulari di questa neoplasia a pre-trattamento con la berberina e/o *T. cordifolia* e successivamente a trattamento con i chemioterapici di elezione. Lo scopo è quello di utilizzare un approccio più realisticamente replicabile in una eventuale traslazione all'applicazione clinica.

Il periodo di stage a Marsiglia mi ha dato l'opportunità di imparare nuove tecniche e protocolli sperimentali, al fine di ottenere colture cellulari che riescono a rimanere vitali per diverse settimane o addirittura mesi, in modo tale da by-passare le criticità riscontrate qui in Italia, durante le prove di messa in coltura delle biopsie tumorali e sane. Un possibile sviluppo futuro del mio progetto potrebbe essere rappresentato dall'isolamento degli organoidi dalle biopsie di pazienti affetti da tumore al colon e individui sani, allo scopo di replicare gli esperimenti svolti durante questi 3 anni di dottorato, su un modello però più aderente alla realtà dell'*in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, and Perucho M. Ubiquitous Somatic Mutations in Simple Repeated Sequences Reveal a New Mechanism for Colonic Carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(issue):558-61.
- 2 Markowitz SD, and Bertagnolli MM. Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* 2009; 361(issue):2449-60.
- 3 Hoeijmakers JHJ. Molecular Origins of Cancer DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine* 2009; 361(issue):1475-85.
- 4 Lao VV, and Grady WM. Epigenetics and Colorectal Cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(issue):686-700.
- 5 Kerr SE, Thomas CB, Thibodeau SN, Ferber MJ, and Halling KC. Apc Germline Mutations in Individuals Being Evaluated for Familial Adenomatous Polyposis: A Review of the Mayo Clinic Experience with 1591 Consecutive Tests. *J Mol Diagn* 2013; 15(issue):31-43.
- 6 Shang S, Hua F, and Hu ZW. The Regulation of Beta-Catenin Activity and Function in Cancer: Therapeutic Opportunities. *Oncotarget* 2017; 8(issue):33972-89.
- 7 He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, and Kinzler KW. Identification of C-Myc as a Target of the Apc Pathway. *Science* 1998; 281(issue):1509-12.
- 8 Tetsu O, and McCormick F. Beta-Catenin Regulates Expression of Cyclin D1 in Colon Carcinoma Cells. *Nature* 1999; 398(issue):422-6.
- 9 Gooding JM, Yap KL, and Ikura M. The Cadherin-Catenin Complex as a Focal Point of Cell Adhesion and Signalling: New Insights from Three-Dimensional Structures. *Bioessays* 2004; 26(issue):497-511.
- 10 Huber AH SD, Laurents DV, Nelson WJ, Weis WI. The Cadherin Cytoplasmic Domain Is Unstructured in the Absence of Beta-Catenin. A Possible Mechanism for Regulating Cadherin Turnover. *J Biol Chem*. 2001; 276(issue):12301-9.
- 11 van Roy F, and Berx G. The Cell-Cell Adhesion Molecule E-Cadherin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2008; 65(issue):3756-88.
- 12 Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, and Charalabopoulos K. The E-Cadherin Adhesion Molecule and Colorectal Cancer. A Global Literature Approach. *Anticancer Research* 2008; 28(issue):3815-26.
- 13 Christou N, Perraud A, Blondy S, Jauberteau MO, Battu S, and Mathonnet M. E-Cadherin: A Potential Biomarker of Colorectal Cancer Prognosis. *Oncol Lett* 2017; 13(issue):4571-76.
- 14 Saldanha G GV, Potter L, Fletcher A. Nuclear Beta-Catenin in Basal Cell Carcinoma Correlates with Increased Proliferation. *Br J Dermatol*. 2004; 151(issue):157-64.
- 15 Fodde R. The Apc Gene in Colorectal Cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38(issue):867-71.
- 16 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, and Chang DD. Wild-Type Kras Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26(issue):1626-34.
- 17 Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, and Jung A. Frequency and Type of Kras Mutations in Routine Diagnostic Analysis of Metastatic Colorectal Cancer. *Pathol Res Pract* 2009; 205(issue):858-62.

- 18 Tan C, and Du X. Kras Mutation Testing in Metastatic Colorectal Cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18(issue):5171-80.
- 19 Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, and Zalberg JR. K-Ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(issue):1757-65.
- 20 Margetis N, Kouloukoussa M, Pavlou K, Vrakas S, and Mariolis-Sapsakos T. K-Ras Mutations as the Earliest Driving Force in a Subset of Colorectal Carcinomas. *In Vivo* 2017; 31(issue):527-42.
- 21 Malumbres M, and Barbacid M. Ras Oncogenes: The First 30 Years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(issue):459-65.
- 22 Lowy DR, and Willumsen BM. Function and Regulation of Ras. *Annual Review of Biochemistry* 1993; 62(issue):851-91.
- 23 Munro AJ, Lain S, and Lane DP. P53 Abnormalities and Outcomes in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Br J Cancer* 2005; 92(issue):434-44.
- 24 Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, and Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012; 5(issue):19-27.
- 25 Adrover E, Maestro ML, Sanz-Casla MT, del Barco V, Cerdan J, Fernandez C, and Balibrea JL. Expression of High P53 Levels in Colorectal Cancer: A Favourable Prognostic Factor. *Br J Cancer* 1999; 81(issue):122-6.
- 26 Grady WM, and Markowitz SD. Genetic and Epigenetic Alterations in Colon Cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3(issue):101-28.
- 27 Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6(issue):479-507.
- 28 Bogaert J, and Prenen H. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Ann Gastroenterol* 2014; 27(issue):9-14.
- 29 Carracedo A, and Pandolfi PP. The Pten-Pi3k Pathway: Of Feedbacks and Cross-Talks. *Oncogene* 2008; 27(issue):5527-41.
- 30 Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Shima K, Irahara N, Kure S, Chan AT, Engelman JA, Kraft P, Cantley LC, Giovannucci EL, and Fuchs CS. Pik3ca Mutation Is Associated with Poor Prognosis among Patients with Curatively Resected Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(issue):1477-84.
- 31 Liu XQ, Rajput A, Geng L, Ongchin M, Chaudhuri A, and Wang J. Restoration of Transforming Growth Factor-Beta Receptor Ii Expression in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability Increases Metastatic Potential in Vivo. *J Biol Chem* 2011; 286(issue):16082-90.
- 32 Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, and Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(issue):2044-58.
- 33 Harrison K-BE-F-, Harrison - Principi Di Medicina Interna. ed. by Italia McGraw-Hill. 16 edn. 3 vols, Harrison Series (2007).
- 34 Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, and Hiraishi H. Molecular Pathogenesis of Sporadic Colorectal Cancers. *Chin J Cancer* 2016; 35(issue):4.
- 35 Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, and Kinzler KW. Apc Mutations Occur Early During Colorectal Tumorigenesis. *Nature* 1992; 359(issue):235-7.
- 36 Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, and Ruzzo A. High Concordance of Kras Status between Primary Colorectal Tumors and Related Metastatic Sites: Implications for Clinical Practice. *Oncologist* 2008; 13(issue):1270-75.

- 37 Pretlow TP, and Pretlow TG. Mutant Kras in Aberrant Crypt Foci (Acf): Initiation of Colorectal Cancer? *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756(issue):83-96.
- 38 Li XL, Zhou J, Chen ZR, and Chng WJ. P53 Mutations in Colorectal Cancer - Molecular Pathogenesis and Pharmacological Reactivation. *World J Gastroenterol* 2015; 21(issue):84-93.
- 39 Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, and Saji S. Somatic Alterations of the Smad-2 Gene in Human Colorectal Cancers. *Br J Cancer* 1998; 78(issue):1152-5.
- 40 Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, and Saji S. Somatic Alterations of the Dpc4 Gene in Human Colorectal Cancers in Vivo. *Gastroenterology* 1996; 111(issue):1369-72.
- 41 Pancione M, Remo A, and Colantuoni V. Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Patholog Res Int* 2012; 2012(issue):509348.
- 42 Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, Saito K, Slezak P, Jaramillo E, Rubio C, Koizumi K, Hirakawa K, and Boland CR. Genetic Pathways in the Evolution of Morphologically Distinct Colorectal Neoplasms. *Cancer Research* 2001; 61(issue):2676-83.
- 43 Boland CR, and Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(issue):2073-87 e3.
- 44 Neuman HB, O'Connor ES, Weiss J, Loconte NK, Greenblatt DY, Greenberg CC, and Smith MA. Surgical Treatment of Colon Cancer in Patients Aged 80 Years and Older : Analysis of 31,574 Patients in the Seer-Medicare Database. *Cancer* 2013; 119(issue):639-47.
- 45 Sargent D, Sobrero A, Grothey A, O'Connell MJ, Buyse M, Andre T, Zheng Y, Green E, Labianca R, O'Callaghan C, Seitz JF, Francini G, Haller D, Yothers G, Goldberg R, and de Gramont A. Evidence for Cure by Adjuvant Therapy in Colon Cancer: Observations Based on Individual Patient Data from 20,898 Patients on 18 Randomized Trials. *J Clin Oncol* 2009; 27(issue):872-7.
- 46 Taylor. *ASaI, Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented:Part Iv Colon Cancer* (2001).
- 47 James N. Gerson M, and Efrat Dotan, M. Adjuvant Chemotherapy in the Treatment of Colon Cancer. *Hematology-Oncology Board Review Manual*; 12 (issue).
- 48 Lakshmi Chintala SV, Joaquina Baranda, Stephen K. Williamson. Capecitabine Versus 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer: Where Are We Now? *Oncology Reviews* 2011; 5(issue):129-40.
- 49 Arkenau HT, Bermann A, Rettig K, Strohmeyer G, Porschen R, and Gastrointestin A. 5-Fluorouracil Plus Leucovorin Is an Effective Adjuvant Chemotherapy in Curatively Resected Stage Iii Colon Cancer: Long-Term Follow-up Results of the Adjcca-01 Trial. *Annals of Oncology* 2003; 14(issue):395-99.
- 50 Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, Sharif S, Petrelli NJ, Lopa SH, and Wolmark N. Bevacizumab in Stage Ii-Iii Colon Cancer: 5-Year Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 Trial. *J Clin Oncol* 2013; 31(issue):359-64.
- 51 Ellis LM. Mechanisms of Action of Bevacizumab as a Component of Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Semin Oncol* 2006; 33(issue):S1-7.
- 52 Kim D, Kim SY, Lee JS, Hong YS, Kim JE, Kim KP, Kim J, Jang SJ, Yoon YK, and Kim TW. Primary Tumor Location Predicts Poor Clinical Outcome with Cetuximab in Ras Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *BMC Gastroenterol* 2017; 17(issue):121.
- 53 Rouyer M FE, Cunha AS, Monnereau A, Noize P, Robinson P, Droz-Perroteau C, Le Monies de Sagazan A, Jové J, Lassalle R, Moore N, Fourier-Réglat A, Smith

- D; EREBUS Study Group. Effectiveness of Cetuximab as First-Line Therapy for Patients with Wild-Type Kras and Unresectable Metastatic Colorectal Cancer in Real-Life Practice: Results of the Erebus Cohort. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 17(issue):129-39.
- 54 Haller DG, Taberero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, Hill M, Gilberg F, Rittweger K, and Schmoll HJ. Capecitabine Plus Oxaliplatin Compared with Fluorouracil and Folinic Acid as Adjuvant Therapy for Stage Iii Colon Cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(issue):1465-71.
- 55 Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A, and Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer I. Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(issue):2343-51.
- 56 Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, and Wolmark N. Oxaliplatin as Adjuvant Therapy for Colon Cancer: Updated Results of Nsabp C-07 Trial, Including Survival and Subset Analyses. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(issue):3768-74.
- 57 He J, Pei L, Jiang H, Yang W, Chen J, and Liang H. Chemoresistance of Colorectal Cancer to 5-Fluorouracil Is Associated with Silencing of the Bnip3 Gene through Aberrant Methylation. *J Cancer* 2017; 8(issue):1187-96.
- 58 Violette S, Poulain L, Dussault E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, Lacorte JM, Staedel C, and Lesuffleur T. Resistance of Colon Cancer Cells to Long-Term 5-Fluorouracil Exposure Is Correlated to the Relative Level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in Addition to Bax and P53 Status. *Int J Cancer* 2002; 98(issue):498-504.
- 59 Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, Lim SJ, and Park JG. Down-Regulation of Mitochondrial F1f0-Atp Synthase in Human Colon Cancer Cells with Induced 5-Fluorouracil Resistance. *Cancer Res* 2005; 65(issue):3162-70.
- 60 Yoo BC, Jeon E, Hong SH, Shin YK, Chang HJ, and Park JG. Metabotropic Glutamate Receptor 4-Mediated 5-Fluorouracil Resistance in a Human Colon Cancer Cell Line. *Clin Cancer Res* 2004; 10(issue):4176-84.
- 61 De Angelis PM, Svendsrud DH, Kravik KL, and Stokke T. Cellular Response to 5-Fluorouracil (5-Fu) in 5-Fu-Resistant Colon Cancer Cell Lines During Treatment and Recovery. *Mol Cancer* 2006; 5(issue):20.
- 62 Khazir J, Riley DL, Pilcher LA, De-Maayer P, and Mir BA. Anticancer Agents from Diverse Natural Sources. *Nat Prod Commun* 2014; 9(issue):1655-69.
- 63 Shaikh R, Pund M, Dawane A, and Iliyas S. Evaluation of Anticancer, Antioxidant, and Possible Anti-Inflammatory Properties of Selected Medicinal Plants Used in Indian Traditional Medication. *J Tradit Complement Med* 2014; 4(issue):253-7.
- 64 Patel BB, Sengupta R, Qazi S, Vachhani H, Yu Y, Rishi AK, and Majumdar AP. Curcumin Enhances the Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Mediating Growth Inhibition of Colon Cancer Cells by Modulating Egfr and Igf-1r. *Int J Cancer* 2008; 122(issue):267-73.
- 65 McCulloch M, Broffman M, van der Laan M, Hubbard A, Kushi L, Abrams DI, Gao J, and Colford JM, Jr. Colon Cancer Survival with Herbal Medicine and Vitamins Combined with Standard Therapy in a Whole-Systems Approach: Ten-Year Follow-up Data Analyzed with Marginal Structural Models and Propensity Score Methods. *Integr Cancer Ther* 2011; 10(issue):240-59.
- 66 Garodia P, Ichikawa H, Malani N, Sethi G, and Aggarwal BB. From Ancient Medicine to Modern Medicine: Ayurvedic Concepts of Health and Their Role in Inflammation and Cancer. *J Soc Integr Oncol* 2007; 5(issue):25-37.
- 67 Baliga MS. Triphala, Ayurvedic Formulation for Treating and Preventing Cancer: A Review. *J Altern Complement Med* 2010; 16(issue):1301-8.

- 68 Yu M, Tong X, Qi B, Qu H, Dong S, Yu B, Zhang N, Tang N, Wang L, and Zhang C. Berberine Enhances Chemosensitivity to Irinotecan in Colon Cancer Via Inhibition of Nfkappab. *Mol Med Rep* 2014; 9(issue):249-54.
- 69 Wen C, Wu L, Fu L, Zhang X, and Zhou H. Berberine Enhances the Antitumor Activity of Tamoxifen in Drugsensitive Mcf7 and Drugresistant Mcf7/Tam Cells. *Mol Med Rep* 2016; 14(issue):2250-6.
- 70 Balachandran P, and Govindarajan R. Cancer--an Ayurvedic Perspective. *Pharmacol Res* 2005; 51(issue):19-30.
- 71 Sharma N, Kumar A, Sharma PR, Qayum A, Singh SK, Dutt P, Paul S, Gupta V, Verma MK, Satti NK, and Vishwakarma R. A New Clerodane Furano Diterpene Glycoside from *Tinospora Cordifolia* Triggers Autophagy and Apoptosis in Hct-116 Colon Cancer Cells. *J Ethnopharmacol* 2018; 211(issue):295-310.
- 72 Bala M, Pratap K, Verma PK, Singh B, and Padwad Y. Validation of Ethnomedicinal Potential of *Tinospora Cordifolia* for Anticancer and Immunomodulatory Activities and Quantification of Bioactive Molecules by Hptlc. *J Ethnopharmacol* 2015; 175(issue):131-7.
- 73 Ali H, and Dixit S. Extraction Optimization of *Tinospora Cordifolia* and Assessment of the Anticancer Activity of Its Alkaloid Palmatine. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013(issue):376216.
- 74 Mishra A, Kumar S, and Pandey AK. Scientific Validation of the Medicinal Efficacy of *Tinospora Cordifolia*. *ScientificWorldJournal* 2013; 2013(issue):292934.
- 75 Chi S, She G, Han D, Wang W, Liu Z, and Liu B. Genus *Tinospora*: Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016(issue):9232593.
- 76 Saha S, and Ghosh S. *Tinospora Cordifolia*: One Plant, Many Roles. *Anc Sci Life* 2012; 31(issue):151-9.
- 77 Khan RVaAB. Antioxidant, Immunomodulatory and Anticancer Potential of *Tinospora Cordifolia* - a Review. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2018; 8(issue):54-69.
- 78 Sangeetha MK, Balaji Raghavendran HR, Gayathri V, and Vasanthi HR. *Tinospora Cordifolia* Attenuates Oxidative Stress and Distorted Carbohydrate Metabolism in Experimentally Induced Type 2 Diabetes in Rats. *J Nat Med* 2011; 65(issue):544-50.
- 79 Abiramasundari G, Sumalatha KR, and Sreepriya M. Effects of *Tinospora Cordifolia* (Menispermaceae) on the Proliferation, Osteogenic Differentiation and Mineralization of Osteoblast Model Systems in Vitro. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(issue):474-80.
- 80 Chaudhary R, Jahan S, and Goyal PK. Chemopreventive Potential of an Indian Medicinal Plant (*Tinospora Cordifolia*) on Skin Carcinogenesis in Mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2008; 27(issue):233-43.
- 81 Tambekar DH, Khante BS, Chandak BR, Titare AS, Boralkar SS, and Aghadte SN. Screening of Antibacterial Potentials of Some Medicinal Plants from Melghat Forest in India. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2009; 6(issue):228-32.
- 82 Lahiri SC, and Dutta NK. Berberine and Chloramphenicol in the Treatment of Cholera and Severe Diarrhoea. *J Indian Med Assoc* 1967; 48(issue):1-11.
- 83 Sun D, Abraham SN, and Beachey EH. Influence of Berberine Sulfate on Synthesis and Expression of Pap Fimbrial Adhesin in Uropathogenic *Escherichia Coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(issue):1274-7.
- 84 Zhang WL, Zhu L, and Jiang JG. Active Ingredients from Natural Botanicals in the Treatment of Obesity. *Obes Rev* 2014; 15(issue):957-67.

- 85 Chen C, Yu Z, Li Y, Fichna J, and Storr M. Effects of Berberine in the Gastrointestinal Tract - a Review of Actions and Therapeutic Implications. *Am J Chin Med* 2014; 42(issue):1053-70.
- 86 Gibbs PJ, Seddon, K.R. Berberine. *Altern Med Rev* 2000; 5(issue):175-77.
- 87 Liu C, Wang Z, Song Y, Wu D, Zheng X, Li P, Jin J, Xu N, and Li L. Effects of Berberine on Amelioration of Hyperglycemia and Oxidative Stress in High Glucose and High Fat Diet-Induced Diabetic Hamsters in Vivo. *Biomed Res Int* 2015; 2015(issue):313808.
- 88 Tillhon M, Guaman Ortiz LM, Lombardi P, and Scovassi AI. Berberine: New Perspectives for Old Remedies. *Biochem Pharmacol* 2012; 84(issue):1260-7.
- 89 Kim S, Han J, Kim NY, Lee SK, Cho DH, Choi MY, Kim JS, Kim JH, Choe JH, Nam SJ, and Lee JE. Effect of Berberine on P53 Expression by Tpa in Breast Cancer Cells. *Oncol Rep* 2012; 27(issue):210-5.
- 90 Abd El-Wahab AE, Ghareeb DA, Sarhan EE, Abu-Serie MM, and El Demellawy MA. In Vitro Biological Assessment of Berberis Vulgaris and Its Active Constituent, Berberine: Antioxidants, Anti-Acetylcholinesterase, Anti-Diabetic and Anticancer Effects. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13(issue):218.
- 91 Seo YS, Yim MJ, Kim BH, Kang KR, Lee SY, Oh JS, You JS, Kim SG, Yu SJ, Lee GJ, Kim DK, Kim CS, Kim JS, and Kim JS. Berberine-Induced Anticancer Activities in Fadu Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Oncol Rep* 2015; 34(issue):3025-34.
- 92 Wang K, Feng X, Chai L, Cao S, and Qiu F. The Metabolism of Berberine and Its Contribution to the Pharmacological Effects. *Drug Metab Rev* 2017; 49(issue):139-57.
- 93 Guaman Ortiz LM, Tillhon M, Parks M, Dutto I, Prosperi E, Savio M, Arcamone AG, Buzzetti F, Lombardi P, and Scovassi AI. Multiple Effects of Berberine Derivatives on Colon Cancer Cells. *Biomed Res Int* 2014; 2014(issue):924585.
- 94 Liu X, Ji Q, Ye N, Sui H, Zhou L, Zhu H, Fan Z, Cai J, and Li Q. Berberine Inhibits Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer Cells Via Cox-2/Pge2 Mediated Jak2/Stat3 Signaling Pathway. *PLoS One* 2015; 10(issue):e0123478.
- 95 Ruan H, Zhan YY, Hou J, Xu B, Chen B, Tian Y, Wu D, Zhao Y, Zhang Y, Chen X, Mi P, Zhang L, Zhang S, Wang X, Cao H, Zhang W, Wang H, Li H, Su Y, Zhang XK, and Hu T. Berberine Binds R α to Suppress Beta-Catenin Signaling in Colon Cancer Cells. *Oncogene* 2017; 36(issue):6906-18.
- 96 Eo SH, Kim JH, and Kim SJ. Induction of G(2)/M Arrest by Berberine Via Activation of Pi3k/Akt and P38 in Human Chondrosarcoma Cell Line. *Oncol Res* 2014; 22(issue):147-57.
- 97 Wang J, Peng Y, Liu Y, Yang J, Ding N, and Tan W. Berberine, a Natural Compound, Suppresses Hedgehog Signaling Pathway Activity and Cancer Growth. *BMC Cancer* 2015; 15(issue):595.
- 98 La X, Zhang L, Li Z, Yang P, and Wang Y. Berberine-Induced Autophagic Cell Death by Elevating Grp78 Levels in Cancer Cells. *Oncotarget* 2017; 8(issue):20909-24.
- 99 Li J, Liu F, Jiang S, Liu J, Chen X, Zhang S, and Zhao H. Berberine Hydrochloride Inhibits Cell Proliferation and Promotes Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Via the Suppression of the Mmp2 and Bcl-2/Bax Signaling Pathways. *Oncol Lett* 2018; 15(issue):7409-14.
- 100 Pazhang Y, Ahmadian S, Javadifar N, and Shafiezadeh M. Cox-2 and Survivin Reduction May Play a Role in Berberine-Induced Apoptosis in Human Ductal Breast Epithelial Tumor Cell Line. *Tumour Biol* 2012; 33(issue):207-14.
- 101 Wang XB, Wang N, Li HL, Liu M, Cao FJ, Yu XJ, Zhang JX, Tan Y, Xiang LC, and Feng YB. Up-Regulation of Pai-1 and Down-Regulation of Upa Are Involved

- in Suppression of Invasiveness and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells by a Natural Compound Berberine. *International Journal of Molecular Sciences* 2016; 17(issue).
- 102 Choi MS, Oh JH, Kim SM, Jung HY, Yoo HS, Lee YM, Moon DC, Han SB, and Hong JT. Berberine Inhibits P53-Dependent Cell Growth through Induction of Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Int J Oncol* 2009; 34(issue):1221-30.
- 103 Fu L, Chen W, Guo W, Wang J, Tian Y, Shi D, Zhang X, Qiu H, Xiao X, Kang T, Huang W, Wang S, and Deng W. Berberine Targets Ap-2/Htert, Nf-Kappab/Cox-2, Hif-1alpha/Vegf and Cytochrome-C/Caspase Signaling to Suppress Human Cancer Cell Growth. *PLoS One* 2013; 8(issue):e69240.
- 104 Wang N, Feng Y, Zhu M, Tsang CM, Man K, Tong Y, and Tsao SW. Berberine Induces Autophagic Cell Death and Mitochondrial Apoptosis in Liver Cancer Cells: The Cellular Mechanism. *J Cell Biochem* 2010; 111(issue):1426-36.
- 105 Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, and Wahl GM. Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: Aacr Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 2006; 66(issue):9339-44.
- 106 Dawood S, Austin L, and Cristofanilli M. Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. *Oncology (Williston Park)* 2014; 28(issue):1101-7, 10.
- 107 Zeuner A, Todaro M, Stassi G, and De Maria R. Colorectal Cancer Stem Cells: From the Crypt to the Clinic. *Cell Stem Cell* 2014; 15(issue):692-705.
- 108 Enderling H, Hlatky L, and Hahnfeldt P. Cancer Stem Cells: A Minor Cancer Subpopulation That Redefines Global Cancer Features. *Front Oncol* 2013; 3(issue):76.
- 109 Michor F, and Polyak K. The Origins and Implications of Intratumor Heterogeneity. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(issue):1361-4.
- 110 Tang DG. Understanding Cancer Stem Cell Heterogeneity and Plasticity. *Cell Res* 2012; 22(issue):457-72.
- 111 Meacham CE, and Morrison SJ. Tumour Heterogeneity and Cancer Cell Plasticity. *Nature* 2013; 501(issue):328-37.
- 112 Vlashi E, and Pajonk F. Cancer Stem Cells, Cancer Cell Plasticity and Radiation Therapy. *Semin Cancer Biol* 2015; 31(issue):28-35.
- 113 Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, and Clarke MF. Phenotypic Characterization of Human Colorectal Cancer Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(issue):10158-63.
- 114 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, and De Maria R. Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells. *Nature* 2007; 445(issue):111-5.
- 115 Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, and Papavassiliou AG. Colorectal Cancer Stem Cells. *Stem Cells* 2012; 30(issue):363-71.
- 116 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, and Weissman IL. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* 2001; 414(issue):105-11.
- 117 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, and Dick JE. A Human Colon Cancer Cell Capable of Initiating Tumour Growth in Immunodeficient Mice. *Nature* 2007; 445(issue):106-10.
- 118 Cheng L, Ramesh AV, Flesken-Nikitin A, Choi J, and Nikitin AY. Mouse Models for Cancer Stem Cell Research. *Toxicol Pathol* 2010; 38(issue):62-71.
- 119 Boman BM, Wicha MS, Fields JZ, and Runquist OA. Symmetric Division of Cancer Stem Cells--a Key Mechanism in Tumor Growth That Should Be Targeted in Future Therapeutic Approaches. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81(issue):893-8.

- 120 Morrison SJ, and Kimble J. Asymmetric and Symmetric Stem-Cell Divisions in Development and Cancer. *Nature* 2006; 441(issue):1068-74.
- 121 Sayon Basu GH, Avri Ben-Ze'ev. Wnt Signaling in Cancer Stem Cells and Colon Cancer Metastasis. *F1000 Faculty Rev* 2016; 699(issue).
- 122 Prasetyanti PR, Zimmerlin CD, Bots M, Vermeulen L, Melo Fde S, and Medema JP. Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation by Wnt and Notch Are Conserved Throughout the Adenoma-Carcinoma Sequence in the Colon. *Mol Cancer* 2013; 12(issue):126.
- 123 Fender AW, Nutter JM, Fitzgerald TL, Bertrand FE, and Sigounas G. Notch-1 Promotes Stemness and Epithelial to Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. *J Cell Biochem* 2015; 116(issue):2517-27.
- 124 Venkatesh V, Nataraj R, Thangaraj GS, Karthikeyan M, Gnanasekaran A, Kagineelli SB, Kuppanna G, Kallappa CG, and Basalingappa KM. Targeting Notch Signalling Pathway of Cancer Stem Cells. *Stem Cell Investig* 2018; 5(issue):5.
- 125 Srinivasan T, Walters J, Bu P, Than EB, Tung KL, Chen KY, Panarelli N, Milsom J, Augenlicht L, Lipkin SM, and Shen X. Notch Signaling Regulates Asymmetric Cell Fate of Fast- and Slow-Cycling Colon Cancer-Initiating Cells. *Cancer Res* 2016; 76(issue):3411-21.
- 126 Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, and Ruiz i Altaba A. Human Colon Cancer Epithelial Cells Harbour Active Hedgehog-Gli Signalling That Is Essential for Tumour Growth, Recurrence, Metastasis and Stem Cell Survival and Expansion. *EMBO Mol Med* 2009; 1(issue):338-51.
- 127 Gupta S, Takebe N, and Lorusso P. Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2010; 2(issue):237-50.
- 128 Mishra L, Shetty K, Tang Y, Stuart A, and Byers SW. The Role of Tgf-Beta and Wnt Signaling in Gastrointestinal Stem Cells and Cancer. *Oncogene* 2005; 24(issue):5775-89.
- 129 Chanmee T, Ontong P, Mochizuki N, Kongtawelert P, Konno K, and Itano N. Excessive Hyaluronan Production Promotes Acquisition of Cancer Stem Cell Signatures through the Coordinated Regulation of Twist and the Transforming Growth Factor Beta (Tgf-Beta)-Snail Signaling Axis. *J Biol Chem* 2014; 289(issue):26038-56.
- 130 Zhao B, Li L, Lei Q, and Guan KL. The Hippo-Yap Pathway in Organ Size Control and Tumorigenesis: An Updated Version. *Genes Dev* 2010; 24(issue):862-74.
- 131 Wei W, Tweardy DJ, Zhang M, Zhang X, Landua J, Petrovic I, Bu W, Roarty K, Hilsenbeck SG, Rosen JM, and Lewis MT. Stat3 Signaling Is Activated Preferentially in Tumor-Initiating Cells in Claudin-Low Models of Human Breast Cancer. *Stem Cells* 2014; 32(issue):2571-82.
- 132 Lin L, Liu A, Peng Z, Lin HJ, Li PK, Li C, and Lin J. Stat3 Is Necessary for Proliferation and Survival in Colon Cancer-Initiating Cells. *Cancer Res* 2011; 71(issue):7226-37.
- 133 Templeton AK, Miyamoto S, Babu A, Munshi A, and Ramesh R. Cancer Stem Cells: Progress and Challenges in Lung Cancer. *Stem Cell Investig* 2014; 1(issue):9.
- 134 Skvortsov S, Debbage P, Lukas P, and Skvortsova I. Crosstalk between DNA Repair and Cancer Stem Cell (Csc) Associated Intracellular Pathways. *Semin Cancer Biol* 2015; 31(issue):36-42.
- 135 Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, and Ellis LM. Chronic Oxaliplatin Resistance Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res* 2006; 12(issue):4147-53.

- 136 Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, and Gurney AL. Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy. *PLoS One* 2008; 3(issue):e2428.
- 137 Touil Y, Igoudjil W, Corvaisier M, Dessein AF, Vandomme J, Monte D, Stechly L, Skrypek N, Langlois C, Gard G, Millet G, Leteurtre E, Dumont P, Truant S, Pruvot FR, Hebbar M, Fan F, Ellis LM, Formstecher P, Van Seuningen I, Gespach C, Polakowska R, and Huet G. Colon Cancer Cells Escape 5fu Chemotherapy-Induced Cell Death by Entering Stemness and Quiescence Associated with the C-Yes/Yap Axis. *Clin Cancer Res* 2014; 20(issue):837-46.
- 138 Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, Qian D, Lam JS, Ailles LE, Wong M, Joshua B, Kaplan MJ, Wapnir I, Dirbas FM, Somlo G, Garberoglio C, Paz B, Shen J, Lau SK, Quake SR, Brown JM, Weissman IL, and Clarke MF. Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells. *Nature* 2009; 458(issue):780-3.
- 139 Gottesman MM, Fojo T, and Bates SE. Multidrug Resistance in Cancer: Role of Atp-Dependent Transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(issue):48-58.
- 140 Polgar O, and Bates SE. Abc Transporters in the Balance: Is There a Role in Multidrug Resistance? *Biochem Soc Trans* 2005; 33(issue):241-5.
- 141 Dean M, Hamon Y, and Chimini G. The Human Atp-Binding Cassette (Abc) Transporter Superfamily. *J Lipid Res* 2001; 42(issue):1007-17.
- 142 Anderle P, Sengstag T, Mutch DM, Rumbo M, Praz V, Mansourian R, Delorenzi M, Williamson G, and Roberts MA. Changes in the Transcriptional Profile of Transporters in the Intestine Along the Anterior-Posterior and Crypt-Villus Axes. *BMC Genomics* 2005; 6(issue):69.
- 143 Hu T, Li Z, Gao CY, and Cho CH. Mechanisms of Drug Resistance in Colon Cancer and Its Therapeutic Strategies. *World J Gastroenterol* 2016; 22(issue):6876-89.
- 144 Blauz A, and Rychlik B. Drug-Selected Cell Line Panels for Evaluation of the Pharmacokinetic Consequences of Multidrug Resistance Proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2017; 84(issue):57-65.
- 145 Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka P, and Soucek P. The Role of Abc Transporters in Progression and Clinical Outcome of Colorectal Cancer. *Mutagenesis* 2012; 27(issue):187-96.
- 146 Andersen V, Svenningsen K, Knudsen LA, Hansen AK, Holmskov U, Stensballe A, and Vogel U. Novel Understanding of Abc Transporters Abcb1/Mdr/P-Glycoprotein, Abcc2/Mrp2, and Abcg2/Bcrp in Colorectal Pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2015; 21(issue):11862-76.
- 147 Dean M. Abc Transporters, Drug Resistance, and Cancer Stem Cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(issue):3-9.
- 148 Kubiliute R, Sulskyte I, Daniunaite K, Daugelavicius R, and Jarmalaite S. Molecular Features of Doxorubicin-Resistance Development in Colorectal Cancer Cx-1 Cell Line. *Medicina-Lithuania* 2016; 52(issue):298-306.
- 149 Ma L, Liu T, Jin Y, Wei J, Yang Y, and Zhang H. Abcg2 Is Required for Self-Renewal and Chemoresistance of Cd133-Positive Human Colorectal Cancer Cells. *Tumour Biol* 2016; 37(issue):12889-96.
- 150 Butler SJ, Richardson L, Farias N, Morrison J, and Coomber BL. Characterization of Cancer Stem Cell Drug Resistance in the Human Colorectal Cancer Cell Lines Hct116 and Sw480. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017; 490(issue):29-35.

- 151 Kobayashi M, Funayama R, Ohnuma S, Unno M, and Nakayama K. Wnt-Beta-Catenin Signaling Regulates Abcc3 (Mrp3) Transporter Expression in Colorectal Cancer. *Cancer Sci* 2016; 107(issue):1776-84.
- 152 Emmink BL, Verheem A, Van Houdt WJ, Steller EJ, Govaert KM, Pham TV, Piersma SR, Borel Rinkes IH, Jimenez CR, and Kranenburg O. The Secretome of Colon Cancer Stem Cells Contains Drug-Metabolizing Enzymes. *J Proteomics* 2013; 91(issue):84-96.
- 153 Kozovska Z, Patsalias A, Bajzik V, Durinikova E, Demkova L, Jargasova S, Smolkova B, Plava J, Kucerova L, and Matuskova M. Aldh1a Inhibition Sensitizes Colon Cancer Cells to Chemotherapy. *BMC Cancer* 2018; 18(issue):656.
- 154 Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Butzow R, Coukos G, and Zhang L. Distinct Expression Levels and Patterns of Stem Cell Marker, Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1 (Aldh1), in Human Epithelial Cancers. *PLoS One* 2010; 5(issue):e10277.
- 155 Sophos NA, and Vasiliou V. Aldehyde Dehydrogenase Gene Superfamily: The 2002 Update. *Chem Biol Interact* 2003; 143-144(issue):5-22.
- 156 Millard A, Scanlan DJ, Gallagher C, Marsh A, and Taylor PC. Unexpected Evolutionary Proximity of Eukaryotic and Cyanobacterial Enzymes Responsible for Biosynthesis of Retinoic Acid and Its Oxidation. *Mol Biosyst* 2014; 10(issue):380-3.
- 157 Vasiliou V, Pappa A, and Petersen DR. Role of Aldehyde Dehydrogenases in Endogenous and Xenobiotic Metabolism. *Chem Biol Interact* 2000; 129(issue):1-19.
- 158 Moreb JS. Aldehyde Dehydrogenase as a Marker for Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3(issue):237-46.
- 159 Clark DW, and Palle K. Aldehyde Dehydrogenases in Cancer Stem Cells: Potential as Therapeutic Targets. *Ann Transl Med* 2016; 4(issue):518.
- 160 Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, and Boman BM. Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (Sc) and Tracks Sc Overpopulation During Colon Tumorigenesis. *Cancer Res* 2009; 69(issue):3382-9.
- 161 Carpentino JE, Hynes MJ, Appelman HD, Zheng T, Steindler DA, Scott EW, and Huang EH. Aldehyde Dehydrogenase-Expressing Colon Stem Cells Contribute to Tumorigenesis in the Transition from Colitis to Cancer. *Cancer Res* 2009; 69(issue):8208-15.
- 162 Xu X, Chai S, Wang P, Zhang C, Yang Y, Yang Y, and Wang K. Aldehyde Dehydrogenases and Cancer Stem Cells. *Cancer Lett* 2015; 369(issue):50-7.
- 163 Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, and Hara A. Aldehyde Dehydrogenase 1a1 in Stem Cells and Cancer. *Oncotarget* 2016; 7(issue):11018-32.
- 164 Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, and Stassi G. Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1(issue):389-402.
- 165 Iannolo G, Conticello C, Memeo L, and De Maria R. Apoptosis in Normal and Cancer Stem Cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66(issue):42-51.
- 166 Jagani Z, and Khosravi-Far R. Cancer Stem Cells and Impaired Apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2008; 615(issue):331-44.
- 167 Fulda S, and Pervaiz S. Apoptosis Signaling in Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(issue):31-8.
- 168 Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AM, Ng K, Ma J, Wienholds E, Dunant C, Pollett A, Gallinger S, McPherson J, Mullighan CG,

- Shibata D, and Dick JE. Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Response in Colorectal Cancer. *Science* 2013; 339(issue):543-8.
- 169 Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, and Herlyn M. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. *Cell* 2010; 141(issue):583-94.
- 170 Saito Y, Uchida N, Tanaka S, Suzuki N, Tomizawa-Murasawa M, Sone A, Najima Y, Takagi S, Aoki Y, Wake A, Taniguchi S, Shultz LD, and Ishikawa F. Induction of Cell Cycle Entry Eliminates Human Leukemia Stem Cells in a Mouse Model of Aml. *Nat Biotechnol* 2010; 28(issue):275-80.
- 171 Kreso A, and Dick JE. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* 2014; 14(issue):275-91.
- 172 Li H, Chen YX, Wen JG, and Zhou HH. Metastasis-Associated in Colon Cancer 1: A Promising Biomarker for the Metastasis and Prognosis of Colorectal Cancer. *Oncol Lett* 2017; 14(issue):3899-908.
- 173 Ye X, and Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol* 2015; 25(issue):675-86.
- 174 Beerling E, Seinstra D, de Wit E, Kester L, van der Velden D, Maynard C, Schafer R, van Diest P, Voest E, van Oudenaarden A, Vrisekoop N, and van Rheenen J. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks Emt from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Rep* 2016; 14(issue):2281-8.
- 175 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, and Weinberg RA. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 2008; 133(issue):704-15.
- 176 Scheel C, and Weinberg RA. Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition: Concepts and Molecular Links. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(issue):396-403.
- 177 Hsu CL, Chung FH, Chen CH, Hsu TT, Liu SM, Chung DS, Hsu YF, Chen CL, Ma N, and Lee HC. Genotypes of Cancer Stem Cells Characterized by Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Proliferation Related Functions. *Sci Rep* 2016; 6(issue):32523.
- 178 Turner C, and Kohandel M. Quantitative Approaches to Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(issue):374-8.
- 179 Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Cespedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangués R, Massagué J, Sancho E, and Batlle E. Dependency of Colorectal Cancer on a Tgf-Beta-Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation. *Cancer Cell* 2012; 22(issue):571-84.
- 180 Chruscik A, Gopalan V, and Lam AK. The Clinical and Biological Roles of Transforming Growth Factor Beta in Colon Cancer Stem Cells: A Systematic Review. *Eur J Cell Biol* 2018; 97(issue):15-22.
- 181 Anderson EC, Hessman C, Levin TG, Monroe MM, and Wong MH. The Role of Colorectal Cancer Stem Cells in Metastatic Disease and Therapeutic Response. *Cancers (Basel)* 2011; 3(issue):319-39.
- 182 Chang JC. Cancer Stem Cells: Role in Tumor Growth, Recurrence, Metastasis, and Treatment Resistance. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(issue):S20-5.
- 183 Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, and Clarke MF. Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(issue):3983-8.

- 184 Fillmore CM, and Kuperwasser C. Human Breast Cancer Cell Lines Contain Stem-Like Cells That Self-Renew, Give Rise to Phenotypically Diverse Progeny and Survive Chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10(issue):R25.
- 185 Cioce M, Gherardi S, Viglietto G, Strano S, Blandino G, Muti P, and Ciliberto G. Mammosphere-Forming Cells from Breast Cancer Cell Lines as a Tool for the Identification of Csc-Like- and Early Progenitor-Targeting Drugs. *Cell Cycle* 2010; 9(issue):2878-87.
- 186 Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J, and Castellano L. Mammosphere Formation Assay from Human Breast Cancer Tissues and Cell Lines. *J Vis Exp* 2015; (issue).
- 187 O'Brien CA, Kreso A, and Dick JE. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: An Overview. *Semin Radiat Oncol* 2009; 19(issue):71-7.
- 188 Shaheen S, Ahmed M, Lorenzi F, and Nateri AS. Spheroid-Formation (Colonsphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Rev* 2016; 12(issue):492-9.
- 189 Basakran NS. Cd44 as a Potential Diagnostic Tumor Marker. *Saudi Med J* 2015; 36(issue):273-9.
- 190 Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, and Chen Q. Cd44 Is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(issue):6751-60.
- 191 Huh JW, Kim HR, Kim YJ, Lee JH, Park YS, Cho SH, and Joo JK. Expression of Standard Cd44 in Human Colorectal Carcinoma: Association with Prognosis. *Pathol Int* 2009; 59(issue):241-6.
- 192 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Cacerescortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, and Dick JE. A Cell Initiating Human Acute Myeloid-Leukemia after Transplantation into Scid Mice. *Nature* 1994; 367(issue):645-48.
- 193 Trosko JE. Review Paper: Cancer Stem Cells and Cancer Nonstem Cells: From Adult Stem Cells or from Reprogramming of Differentiated Somatic Cells. *Vet Pathol* 2009; 46(issue):176-93.
- 194 Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, and Clevers H. Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5. *Nature* 2007; 449(issue):1003-7.
- 195 de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es JE, Guardavaccaro D, Schasfoort RB, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJ, and Clevers H. Lgr5 Homologues Associate with Wnt Receptors and Mediate R-Spondin Signalling. *Nature* 2011; 476(issue):293-7.
- 196 Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, and Clevers H. Crypt Stem Cells as the Cells-of-Origin of Intestinal Cancer. *Nature* 2009; 457(issue):608-11.
- 197 Barker N. Adult Intestinal Stem Cells: Critical Drivers of Epithelial Homeostasis and Regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(issue):19-33.
- 198 de Lau W, Barker N, and Clevers H. Wnt Signaling in the Normal Intestine and Colorectal Cancer. *Front Biosci* 2007; 12(issue):471-91.
- 199 Krausova M, and Korinek V. Wnt Signaling in Adult Intestinal Stem Cells and Cancer. *Cell Signal* 2014; 26(issue):570-9.
- 200 Clarke MF, and Fuller M. Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve. *Cell* 2006; 124(issue):1111-5.
- 201 Lamprecht S, and Fich A. The Cancer Cells-of-Origin in the Gastrointestinal Tract: Progenitors Revisited. *Carcinogenesis* 2015; 36(issue):811-6.

- 202 Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, and Regenbrecht CR. Cancer Stem Cells in Solid Tumors: Elusive or Illusive? *Cell Commun Signal* 2010; 8(issue):6.
- 203 Huels DJ, and Sansom OJ. Stem Vs Non-Stem Cell Origin of Colorectal Cancer. *Br J Cancer* 2015; 113(issue):1-5.
- 204 Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulson R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, and Wright NA. Bottom-up Histogenesis of Colorectal Adenomas: Origin in the Monocryptal Adenoma and Initial Expansion by Crypt Fission. *Cancer Res* 2003; 63(issue):3819-25.
- 205 Wright NA, and Poulson R. Top Down or Bottom Up? Competing Management Structures in the Morphogenesis of Colorectal Neoplasms. *Gut* 2002; 51(issue):306-8.
- 206 David Wei-MinTan N. Chapter Three - Intestinal Stem Cells and Their Defining Niche. *Current Topics in Developmental Biology* 2014; 107(issue):77-107.
- 207 Li L, and Neaves WB. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters. *Cancer Res* 2006; 66(issue):4553-7.
- 208 Iwasaki H, and Suda T. Cancer Stem Cells and Their Niche. *Cancer Sci* 2009; 100(issue):1166-72.
- 209 Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, and Huang J. The Cancer Stem Cell Niche: Cross Talk between Cancer Stem Cells and Their Microenvironment. *Tumour Biol* 2014; 35(issue):3945-51.
- 210 Hanahan D, and Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011; 144(issue):646-74.
- 211 Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Goktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Taketo MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC, and Greten FR. Intestinal Tumorigenesis Initiated by Dedifferentiation and Acquisition of Stem-Cell-Like Properties. *Cell* 2013; 152(issue):25-38.
- 212 Polanska UM, and Orimo A. Carcinoma-Associated Fibroblasts: Non-Neoplastic Tumour-Promoting Mesenchymal Cells. *J Cell Physiol* 2013; 228(issue):1651-7.
- 213 Chen WJ, Ho CC, Chang YL, Chen HY, Lin CA, Ling TY, Yu SL, Yuan SS, Chen YJ, Lin CY, Pan SH, Chou HY, Chen YJ, Chang GC, Chu WC, Lee YM, Lee JY, Lee PJ, Li KC, Chen HW, and Yang PC. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate the Plasticity of Lung Cancer Stemness Via Paracrine Signalling. *Nat Commun* 2014; 5(issue):3472.
- 214 Plaks V, Kong N, and Werb Z. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell* 2015; 16(issue):225-38.
- 215 Pirkmajer S, and Chibalin AV. Serum Starvation: Caveat Emptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301(issue):C272-9.
- 216 Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative Pcr and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; 25(issue):402-8.
- 217 Wilson BJ, Schatton T, Zhan Q, Gasser M, Ma J, Saab KR, Schanche R, Waaga-Gasser AM, Gold JS, Huang Q, Murphy GF, Frank MH, and Frank NY. Abcb5 Identifies a Therapy-Refractory Tumor Cell Population in Colorectal Cancer Patients. *Cancer Res* 2011; 71(issue):5307-16.
- 218 Lee SH, Hong HS, Liu ZX, Kim RH, Kang MK, Park NH, and Shin KH. Tnfalpha Enhances Cancer Stem Cell-Like Phenotype Via Notch-Hes1 Activation in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424(issue):58-64.

- 219 Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, Sjostrom B, Dahlqvist A, and Coates PJ. Differential Expression of P63 Isoforms in Normal Tissues and Neoplastic Cells. *J Pathol* 2002; 198(issue):417-27.
- 220 Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, and Garcia De Herreros A. The Transcription Factor Snail Is a Repressor of E-Cadherin Gene Expression in Epithelial Tumour Cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2(issue):84-9.
- 221 Kim YH, Kim G, Kwon CI, Kim JW, Park PW, and Hahm KB. Twist1 and Snail as Markers of Poor Prognosis in Human Colorectal Cancer Are Associated with the Expression of Aldh1 and Tgf-Beta1. *Oncol Rep* 2014; 31(issue):1380-8.
- 222 Walker F, Zhang HH, Odorizzi A, and Burgess AW. Lgr5 Is a Negative Regulator of Tumorigenicity, Antagonizes Wnt Signalling and Regulates Cell Adhesion in Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS One* 2011; 6(issue):e22733.
- 223 Avtanski D, and Poretsky L. Phyto-Polyphenols as Potential Inhibitors of Breast Cancer Metastasis. *Mol Med* 2018; 24(issue):29.
- 224 Lee SJ, and Langhans SA. Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Protein Cdc27 Is a Target for Curcumin-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *BMC Cancer* 2012; 12(issue):44.
- 225 Li JQ, Miki H, Wu F, Sao K, Nishioka M, Ohmori M, and Imaida K. Cyclin a Correlates with Carcinogenesis and Metastasis, and P27(Kip1) Correlates with Lymphatic Invasion, in Colorectal Neoplasms. *Hum Pathol* 2002; 33(issue):1006-15.
- 226 Kim BR, Oh SC, Lee DH, Kim JL, Lee SY, Kang MH, Lee SI, Kang S, Joung SY, and Min BW. Bmp-2 Induces Motility and Invasiveness by Promoting Colon Cancer Stemness through Stat3 Activation. *Tumour Biol* 2015; 36(issue):9475-86.
- 227 Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, and Mori M. Clinical Significance of Bmp7 in Human Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(issue):1530-7.
- 228 Araki K, Shimura T, Suzuki H, Tsutsumi S, Wada W, Yajima T, Kobayahi T, Kubo N, and Kuwano H. E/N-Cadherin Switch Mediates Cancer Progression Via Tgf-Beta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105(issue):1885-93.
- 229 Janouskova H, Ray AM, Noulet F, Lelong-Rebel I, Choulier L, Schaffner F, Lehmann M, Martin S, Teisinger J, and Dontenwill M. Activation of P53 Pathway by Nutlin-3a Inhibits the Expression of the Therapeutic Target Alpha5 Integrin in Colon Cancer Cells. *Cancer Lett* 2013; 336(issue):307-18.
- 230 Wang Y, Ngo VN, Marani M, Yang Y, Wright G, Staudt LM, and Downward J. Critical Role for Transcriptional Repressor Snail2 in Transformation by Oncogenic Ras in Colorectal Carcinoma Cells. *Oncogene* 2010; 29(issue):4658-70.
- 231 Findlay VJ, Wang C, Nogueira LM, Hurst K, Quirk D, Ethier SP, Staveley O'Carroll KF, Watson DK, and Camp ER. Snai2 Modulates Colorectal Cancer 5-Fluorouracil Sensitivity through Mir145 Repression. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(issue):2713-26.
- 232 Brown JR, and DuBois RN. Cox-2: A Molecular Target for Colorectal Cancer Prevention. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(issue):2840-55.
- 233 Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, and Diederich M. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int J Cell Biol* 2010; 2010(issue):215158.
- 234 Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, and Mukhtar H. A Plant Flavonoid Fisetin Induces Apoptosis in Colon Cancer Cells by Inhibition of Cox2 and Wnt/Egfr/Nf-Kappab-Signaling Pathways. *Carcinogenesis* 2009; 30(issue):300-7.
- 235 Stypula-Cyrus Y, Damania D, Kunte DP, Cruz MD, Subramanian H, Roy HK, and Backman V. Hdac up-Regulation in Early Colon Field Carcinogenesis Is Involved

- in Cell Tumorigenicity through Regulation of Chromatin Structure. *PLoS One* 2013; 8(issue):e64600.
- 236 Ryoo IG, Kim G, Choi BH, Lee SH, and Kwak MK. Involvement of Nrf2 Signaling in Doxorubicin Resistance of Cancer Stem Cell-Enriched Colonospheres. *Biomol Ther (Seoul)* 2016; 24(issue):482-8.
- 237 Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, and Fukada T. Zinc Transporter Slc39a7/Zip7 Promotes Intestinal Epithelial Self-Renewal by Resolving Er Stress. *PLoS Genet* 2016; 12(issue):e1006349.
- 238 Ye P, Xing H, Lou F, Wang K, Pan Q, Zhou X, Gong L, and Li D. Histone Deacetylase 2 Regulates Doxorubicin (Dox) Sensitivity of Colorectal Cancer Cells by Targeting Abcb1 Transcription. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 77(issue):613-21.
- 239 Sheng N, Yan L, You W, Tan G, Gong J, Chen H, Yang Y, Hu L, and Wang Z. Knockdown of Slc39a7 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2017; 49(issue):926-34.
- 240 Lancaster MA, and Knoblich JA. Organogenesis in a Dish: Modeling Development and Disease Using Organoid Technologies. *Science* 2014; 345(issue):1247125.
- 241 Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, Ichinose S, Okada Y, Tanaka T, Watanabe M, and Nakamura T. Small Intestinal Stem Cell Identity Is Maintained with Functional Paneth Cells in Heterotopically Grafted Epithelium onto the Colon. *Genes Dev* 2014; 28(issue):1752-7.
- 242 van de Wetering M, Francies HE, Francis JM, Bounova G, Iorio F, Pronk A, van Houdt W, van Gorp J, Taylor-Weiner A, Kester L, McLaren-Douglas A, Blokker J, Jaksani S, Bartfeld S, Volckman R, van Sluis P, Li VS, Seepo S, Sekhar Pedamallu C, Cibulskis K, Carter SL, McKenna A, Lawrence MS, Lichtenstein L, Stewart C, Koster J, Versteeg R, van Oudenaarden A, Saez-Rodriguez J, Vries RG, Getz G, Wessels L, Stratton MR, McDermott U, Meyerson M, Garnett MJ, and Clevers H. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* 2015; 161(issue):933-45.
- 243 Young M, and Reed KR. Organoids as a Model for Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2016; 12(issue):281-87.
- 244 Verissimo CS, Overmeer RM, Ponsioen B, Drost J, Mertens S, Verlaan-Klink I, Gerwen BV, van der Ven M, Wetering MV, Egan DA, Bernards R, Clevers H, Bos JL, and Snippert HJ. Targeting Mutant Ras in Patient-Derived Colorectal Cancer Organoids by Combinatorial Drug Screening. *Elife* 2016; 5(issue).
- 245 Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarro LM, Bradshaw CR, Allen GE, Arnes-Benito R, Sidorova O, Gaspersz MP, Georgakopoulos N, Koo BK, Dietmann S, Davies SE, Prasad RK, Lieshout R, JNM IJ, Wigmore SJ, Saeb-Parsy K, Garnett MJ, van der Laan LJ, and Huch M. Human Primary Liver Cancer-Derived Organoid Cultures for Disease Modeling and Drug Screening. *Nat Med* 2017; 23(issue):1424-35.
- 246 Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, Balgobind AV, Wind K, Gracanin A, Begthel H, Korving J, van Boxtel R, Duarte AA, Lelieveld D, van Hoeck A, Ernst RF, Blokzijl F, Nijman IJ, Hoogstraat M, van de Ven M, Egan DA, Zinzalla V, Moll J, Boj SF, Voest EE, Wessels L, van Diest PJ, Rottenberg S, Vries RGJ, Cuppen E, and Clevers H. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 2018; 172(issue):373-86 e10.
- 247 Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Bertucci F, Cabaud O, Wicinski J, Finetti P, Josselin E, Adelaide J, Nguyen TT, Monville F, Jacquemier J, Thomassin-Piana J,

- Pinna G, Jalaguier A, Lambaudie E, Houvenaeghel G, Xerri L, Harel-Bellan A, Chaffanet M, Viens P, and Birnbaum D. Aldh1-Positive Cancer Stem Cells Predict Engraftment of Primary Breast Tumors and Are Governed by a Common Stem Cell Program. *Cancer Res* 2013; 73(issue):7290-300.
- 248 Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, Van Houdt WJ, Pronk A, Van Gorp J, Siersema PD, and Clevers H. Long-Term Expansion of Epithelial Organoids from Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* 2011; 141(issue):1762-72.
- 249 Shamir ER, and Ewald AJ. Three-Dimensional Organotypic Culture: Experimental Models of Mammalian Biology and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(issue):647-64.
- 250 Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, Gong Z, Zhang S, Zhou J, Cao K, Li X, Xiong W, Li G, Zeng Z, and Guo C. Role of Tumor Microenvironment in Tumorigenesis. *J Cancer* 2017; 8(issue):761-73.
- 251 Ohlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvise M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio, II, Hwang CI, Tiriack H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, and Tuveson DA. Distinct Populations of Inflammatory Fibroblasts and Myofibroblasts in Pancreatic Cancer. *J Exp Med* 2017; 214(issue):579-96.
- 252 Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grunert A, and Bachem MG. Identification of Mediators Stimulating Proliferation and Matrix Synthesis of Rat Pancreatic Stellate Cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(issue):C532-43.
- 253 Ishii G, Ochiai A, and Neri S. Phenotypic and Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblast within the Tumor Microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 99(issue):186-96.
- 254 Attieh Y, and Vignjevic DM. The Hallmarks of Cafs in Cancer Invasion. *Eur J Cell Biol* 2016; 95(issue):493-502.
- 255 Glentis A, Oertle P, Mariani P, Chikina A, El Marjou F, Attieh Y, Zaccarini F, Lae M, Loew D, Dingli F, Sirven P, Schoumacher M, Gurchenkov BG, Plodinec M, and Vignjevic DM. Cancer-Associated Fibroblasts Induce Metalloprotease-Independent Cancer Cell Invasion of the Basement Membrane. *Nat Commun* 2017; 8(issue):924.
- 256 Palmieri A, Iapichino A, Cura F, Scapoli L, Carinci F, Mandrone M, and Martinelli M. Pre-Treatment with Berberine Enhances Effect of 5-Fluorouracil and Cisplatin in Hep2 Laryngeal Cancer Cell Line. *J Biol Regul Homeost Agents* 2018; 32(issue):167-77.