

L'utilizzo dei fattori di differenziazione delle cellule staminali come regolatori epigenetici nelle malattie cronico- degenerative ed in medicina rigenerativa.

Un nuovo modello (Olopattern) del sistema cognitivo mente-corpo.

By Pier Mario Biava - biava@tiscali.it

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Multimedica, Milano

Riassunto

Esperimenti condotti su diverse linee cellulari di tumori umani trattati con i fattori prelevati dall'embrione di Zebrafish a diversi stadi di differenziazione delle cellule staminali hanno evidenziato una significativa riduzione della curva di crescita di tutte le linee cellulari trattate. Ricerche condotte per capire quali eventi molecolari fossero coinvolti in questo tipo di regolazione e di controllo, hanno dimostrato che molecole chiave del ciclo cellulare, quali p53 e pRb, subiscono una regolazione trascrizionale o post-traduzionale. Ricerche sui processi di apoptosi e di differenziazione hanno evidenziato che il trattamento di tumori con i fattori di differenziazione delle cellule staminali induce l'attivazione della caspasi 3, principalmente attraverso la regolazione del gene E2F-1 e conseguentemente una iper-espressione di c-Myc e l'attivazione di un pathway apoptotico p73 dipendente. Inoltre si è dimostrato una contemporanea e significativa normalizzazione del rapporto fra e-caderine e beta catenine, con aumento del livello di e-caderine. Da ultimo la somministrazione di un prodotto messo a punto per la terapia umana, contenente fattori di differenziazione delle cellule staminali, ha dimostrato il 19,8% di regressioni (2,6% di regressioni complete) ed il 16% di stabilizzazioni con significativo aumento del tempo di sopravvivenza in coloro, che hanno risposto al trattamento, in uno studio aperto randomizzato su 179 pazienti affetti da epatocarcinoma in stadio intermedio-avanzato. Uno studio piu' recente su 50 casi di epatocarcinoma in fase intermedio-avanzata ha dimostrato un numero ancora piu' elevato di regressioni complete (13,1%). Inoltre tali fattori di differenziazione utilizzati in modelli di studio per valutare la neurodegenerazione, quali le cellule dell'ippocampo di topo, hanno evidenziato di essere in grado di prevenire in modo statisticamente molto significativo i processi neurodegenerativi indotti da dosi elevate di NMDA (N-Methyl-D-Aspartato). Infine alcuni studi clinici hanno evidenziato un miglioramento molto significativo delle lesioni psoriasiche in circa l'80% dei pazienti, con riduzione o scomparsa delle placche psoriasiche, dell'eritema e del prurito. L'utilizzo di tali fattori ha portato a concepire un nuovo modello del sistema complesso adattativo mente-corpo, in cui si integrano i nuovi concetti di epigenetica e di trasmissione dell'informazione nei sistemi biologici, integrando in esso il sistema PNEI.

Abstract

Experiments on different human tumor cell lines treated with stem cell differentiation stage factors taken from Zebrafish embryos during different stages of cell differentiation demonstrated a significant slowdown in tumor proliferation rate. The studies carried out in order to find out which regulation pathways are involved in the embryo in this mechanism of tumor growth inhibition demonstrated that key cell cycle regulator molecules, such as p53 and pRb, are modified by transcriptional and post-translational processes. Research on apoptosis and differentiation revealed that treatment with stem cell differentiation factors induces caspase 3 activation, mainly by increasing the release of E2F-1, leading to c-Myc overexpression and activation of a p73 apoptotic-dependent pathway. Moreover, a concurrent significant normalization effect on the ratio of e-cadherin and beta catenin, with increase in e-cadherin levels, was observed. Finally, a product prepared for human treatment containing stem cell differentiation stage factors demonstrated 19.8% regression (2.6% of complete regression), 16% stable disease, and a significant difference in survival between the group of patients who responded to treatment versus the group with progression of disease in an open randomized clinical trial on 179 consecutive patients with intermediate-advanced hepatocellular carcinoma. A more recent clinical trial on 50 cases of hepatocellular carcinoma in intermediate-advanced stages demonstrated a greater rate (13.1%) of complete regression. In addition these factors used in a model to study the neurodegenerative processes, like the cells of Hippocampus of mice, demonstrated a significant prevention of neurodegenerative events induced by using high doses of NMDA. Finally some clinical trials demonstrated a significant improvement of psoriasis lesions after the treatment with stem cell differentiations stages factors, with reduction of chertosis, eritema and of itching. The use of stem cell differentiation stage factors has been allowed to conceive a new model of the complex-adaptive body-mind system (Olopattern), in which the PNEI system is well integrated.

Introduzione

E' noto dalla letteratura che il microambiente embrionario è in grado di ridurre o sopprimere lo sviluppo di tumori, quando sono in corso processi di differenziazione cellulare (1,2). Infatti la somministrazione di sostanze sicuramente cancerogene durante l'organogenesi causa malformazioni embrionali, ma non induce la formazione di tumori nella prole. Quando l'organogenesi è terminata, la somministrazione di cancerogeni provoca invece un aumento della frequenza con cui si manifestano tumori nella prole (3,4,5,). Questi dati indicano che il cancro può essere visto come una deviazione del normale sviluppo, suscettibile di controllo da

parte di fattori presenti nel microambiente embrionario durante il periodo del differenziamento cellulare. Inoltre è stato dimostrato che il teratocarcinoma si differenzia in tessuti normali, quando impiantato nell'embrione.(6). Del tutto recentemente è stato evidenziato che l'impianto di un melanoma nell'embrione di Zebrafish non ha dato origine a tumori, laddove l'impianto in pesci adulti ha dato invece origine a tumori (7). Inoltre l'iniezione del melanoma nelle membrane extraembrionali di Zebrafish ha dato origine a cellule del sistema nervoso dello Zebrafish stesso, dimostrando così che le cellule tumorali possono differenziarsi in tessuti normali dell'organismo nel cui embrione sono impiantate (8). Tenendo conto di tale background vengono qui riassunti numerosi esperimenti condotti nell'arco di venti anni sia in vitro, sia in vivo e infine studi clinici su casi di epatocarcinoma in fase intermedia ed avanzata, utilizzando i fattori prelevati in precisi momenti del differenziamento delle cellule staminali. Da ultimo vengono riportati esperimenti più recenti che hanno evidenziato come i fattori di differenziazione delle cellule staminali siano in grado di prevenire i processi neurodegenerativi, utilizzando il modello in vitro costituito dalle cellule dell'ippocampo di topo e come in diversi trials clinici tali fattori si siano dimostrati in grado di apportare miglioramenti significativi in casi di psoriasi.

Materiali e metodi.

I materiali ed i metodi sia degli esperimenti in vitro su differenti linee di tumori umani, sia la selezione dei pazienti ed i metodi usati per quanto riguarda i trials clinici sull'epatocarcinoma sono già stati illustrati.

Anche per quanto si riferisce agli studi clinici sulla psoriasi i materiali e metodi sono già stati pubblicati. Per quanto riguarda lo studio, mai pubblicato, sulla prevenzione della neurodegenerazione, fettine organotipiche ippocampali sono state preparate come già descritto in letteratura (9). Per testare l'effetto degli estratti di zebrafish, fettine organotipiche sono state esposte a NMDA (N-Methyl-D-Aspartato) 50 μ M in Serum Free medium, in presenza o assenza degli estratti. Per ogni tipo di trattamento, è stata valutata l'attività neuroprotettiva della miscela degli estratti (A+B+C). Per valutare il danno cellulare indotto dai differenti trattamenti è stata utilizzata la fluorescenza associata all'uso del propidio ioduro (PI) (5 mg/ml) come già descritto in letteratura (10). L'analisi quantitativa della mortalità cellulare è stata effettuata nell'area CA1 dell'ippocampo utilizzando come termine di paragone il massimo danno cellulare ottenuto esponendo le fettine organotipiche al trattamento con NMDA. Le immagini sono state acquisite con un microscopio a epifluorescenza Zeiss Axiovert 200M (obiettivo 10x), e CoolSnap CCD camera. Per l'analisi quantitativa, le immagini sono state acquisite con gli stessi setting e tempi di esposizione. L'intensità media di fluorescenza è stata determinata dopo aver tracciato l'area corrispondente all'area CA1 e la mortalità analizzata in funzione dell'intensità di fluorescenza e dell'area espressa come pixel².

Risultati degli esperimenti in vitro su diverse linee di tumori umani.

Sette diverse linee di tumori umani (glioblastoma multiforme, melanoma, epatocarcinoma, adenocarcinoma del rene, del colon, della mammella, leucemia linfoblastica acuta) sono stati trattati con i fattori prelevati da embrioni di Zebrafish a quattro diversi stadi di sviluppo: a) stadio di morula, caratterizzato solo da eventi meramente moltiplicativi e pertanto costituito da cellule staminali embrionali totipotenti, b) stadio di medio-blastula-gastrula (50% di epibolia), nel quale le cellule staminali embrionali totipotenti si differenziano in pluripotenti c) stadio di 5 somiti e d) di 20 somiti, nei quali avvengono eventi di differenziazione importanti che caratterizzano la fase intermedia e finale del differenziamento embrionario. Tutte le linee cellulari hanno dimostrato un significativo rallentamento della curva di crescita quando trattate con i fattori prelevati nei diversi momenti del differenziamento cellulare, con percentuali di inibizione che variano dal 73% del glioblastoma al 26% del melanoma. Non si è invece notato alcun effetto di rallentamento della curva di crescita, al contrario un lieve stimolo alla proliferazione tumorale, quando le diverse linee cellulari sono state trattate con i fattori prelevati nello stadio di morula. Tali dati rafforzano il concetto che gli stadi di differenziazione cellulare sono caratterizzati dalla presenza di networks di fattori, che sono in grado di ri-indirizzare le cellule tumorali in una via di normale sviluppo cellulare e che tali networks compaiono nelle primissime fasi del processo di gastrulazione, mentre sono assenti negli stadi meramente moltiplicativi (11). Numerosi studi sono stati condotti per capire quali eventi molecolari fossero coinvolti nei meccanismi di inibizione della crescita tumorale. E' stato dimostrato che le molecole che hanno un ruolo fondamentale nel processo di regolazione del ciclo cellulare, quali p53 e pRb sono coinvolti attraverso eventi di regolazione trascrizionale o post-traduzionale. Più precisamente si è dimostrata una regolazione trascrizionale di p53, evidenziata da un considerevole aumento della concentrazione di tale proteina nelle cellule di alcune linee tumorali, quali il glioblastoma multiforme e il melanoma, sia mediante citofluorimetria, sia mediante metodo immunostochimico, dopo trattamento con i fattori di differenziazione cellulare (12). Su altre linee tumorali, quali ad esempio l'adenocarcinoma del rene, il rallentamento della crescita tumorale è dovuto invece ad una regolazione post-traduzionale della proteina del retinoblastoma (pRb), regolazione che porta ad una modificazione del rapporto fra forma fosforilata e non fosforilata di tale proteina, a favore delle forme non fosforilata (13). Come si sa, la forma non fosforilata blocca il ciclo cellulare, impedendo la trascrizione del gene E2F-1, che invece si verifica, quando la proteina viene fosforilata. Per comprendere infine quali siano le conseguenze dovute alla regolazione del ciclo cellulare delle cellule tumorali da parte dei fattori di differenziazione sono stati studiati sia gli eventi apoptotici, sia di differenziazione cellulare. L'analisi condotta su cellule di adenocarcinoma del colon ha evidenziato, da un lato, sia l'attivazione di un pathway apoptotico dipendente da p73, sia di un pathway di differenziazione cellulare. In effetti nelle

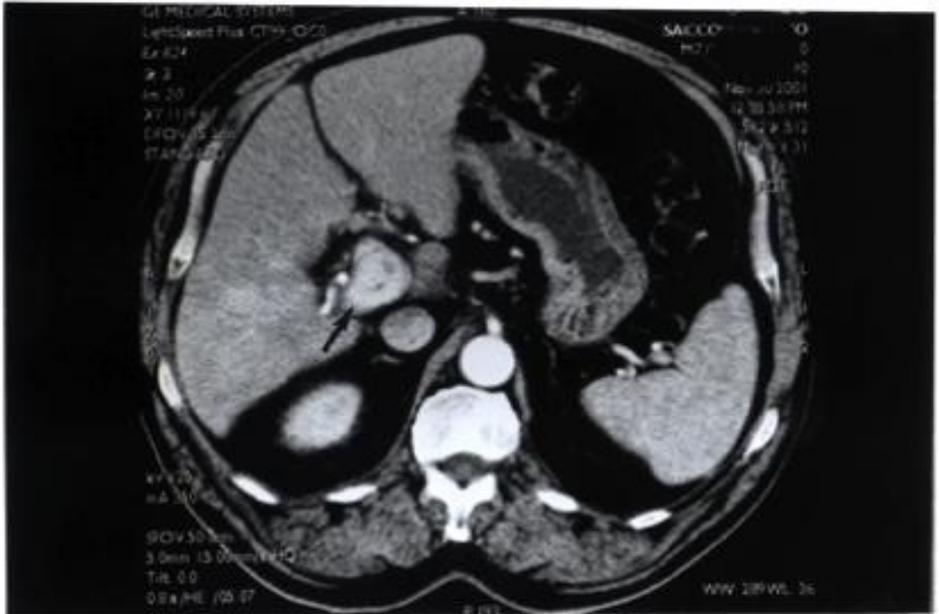
culture di cellule del tumore del colon è stata evidenziato, oltre ad un aumento significativo dell'apoptosi, anche un aumento considerevole della concentrazione di e-caderine, markers del differenziamento cellulare (14). Pertanto i meccanismi molecolari che stanno alla base del rallentamento della crescita tumorale dovuta al trattamento con i fattori di differenziazione delle staminali si possono sintetizzare nel modo seguente: arresto del ciclo cellulare in fase G1-S o G2-M., a seconda del tipo di tumore, riparazione dei danni genetici e ri-differenziazione cellulare, o, qualora la riparazione sia impossibile per la gravità delle mutazioni, apoptosi delle cellule tumorali.

I risultati degli studi clinici sull'epatocarcinoma in fase intermedio-avanzata.

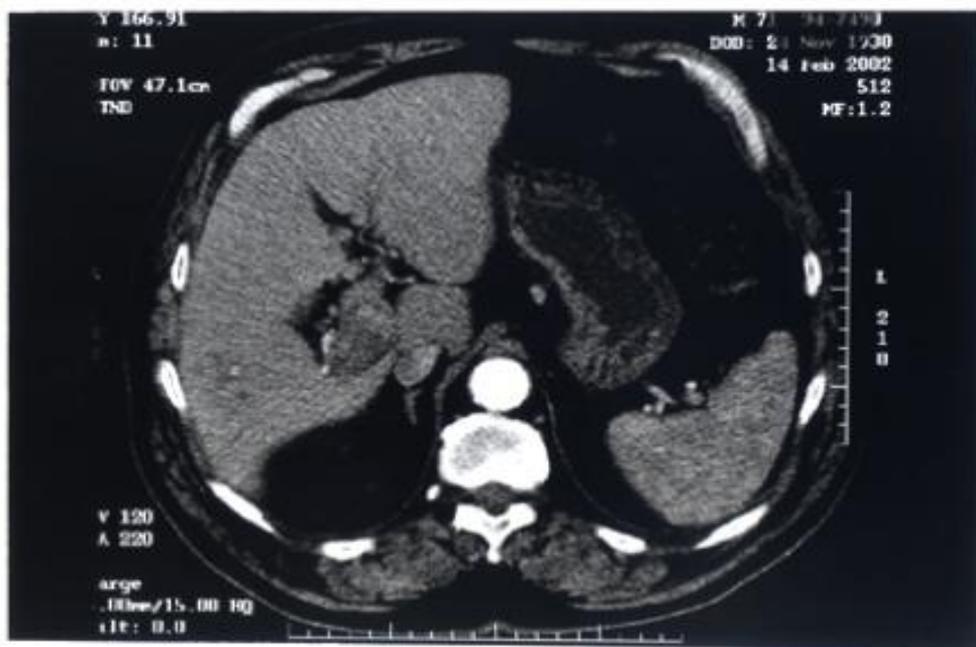
Uno studio clinico randomizzato condotto dal 1° gennaio 2001 ed il 31 aprile 2004 su 179 pazienti affetti da epatocarcinoma in fase intermedia-avanzata, non passibili di nessun altro trattamento quali trapianto, resezione, terapie ablative, chemoembolizzazione, sono stati trattati con un prodotto messo a punto a seguito degli studi sopramenzionati. Tale prodotto è stato somministrato ai pazienti nelle dosi di 30 gocce sublinguali 3 volte al dì. La somministrazione sublinguale è stata scelta in quanto si è evidenziato che la frazione attiva nel rallentamento della crescita tumorale è costituita da proteine ad altri fattori, quali acidi nucleici, con pesi molecolari non elevati. È stata valutata sia la risposta sull'evoluzione del tumore, sia la sopravvivenza dei pazienti, oltre che il performance status. Si è osservato il 19,8% di regressioni ed il 16% di stabilizzazione della malattia, con una sopravvivenza di oltre il 60% a 40 mesi dei pazienti che avevano risposto al trattamento, contro poco più del 10% degli altri pazienti. Si è avuto un miglioramento del performance status nel 82,6% dei pazienti, anche in quelli in cui la malattia è progredita (15). Più recentemente un nuovo lavoro clinico pubblicato su un numero speciale di Current Pharmaceutical Biotechnology, in cui, come Guest Editor, ho affrontato il tema della riprogrammazione delle cellule staminali normali e tumorali, riconferma il ruolo dei fattori di differenziazione delle cellule staminali nel determinare la regressione completa del tumore primitivo del fegato in fase intermedio-avanzata nel 13,1% dei casi (16). Vengono riportati di seguito le TAC di alcuni casi di regressione completa di epatocarcinomi prima e dopo sei mesi di trattamento con fattori di differenziazione delle cellule staminali e le curve di sopravvivenza dei casi

che hanno risposto al trattamento rispetto ai casi di progressione della malattia.

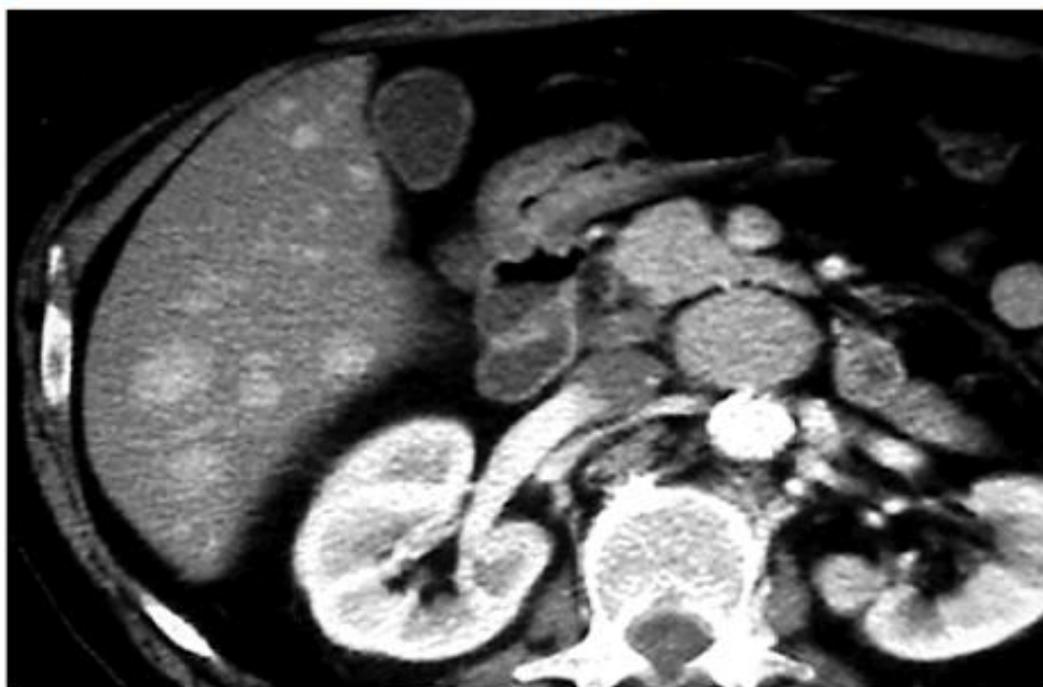
Spiral CT during the arterial phase prior to treatment with stem cell differentiation stage factors (SCDSF) shows an advanced HCC of the right lobe. Neoplastic hypervascularized areas are present in segment 7, and a hypervascularized thrombus (arrow) occupies the right portal branch and reaches the main trunk.



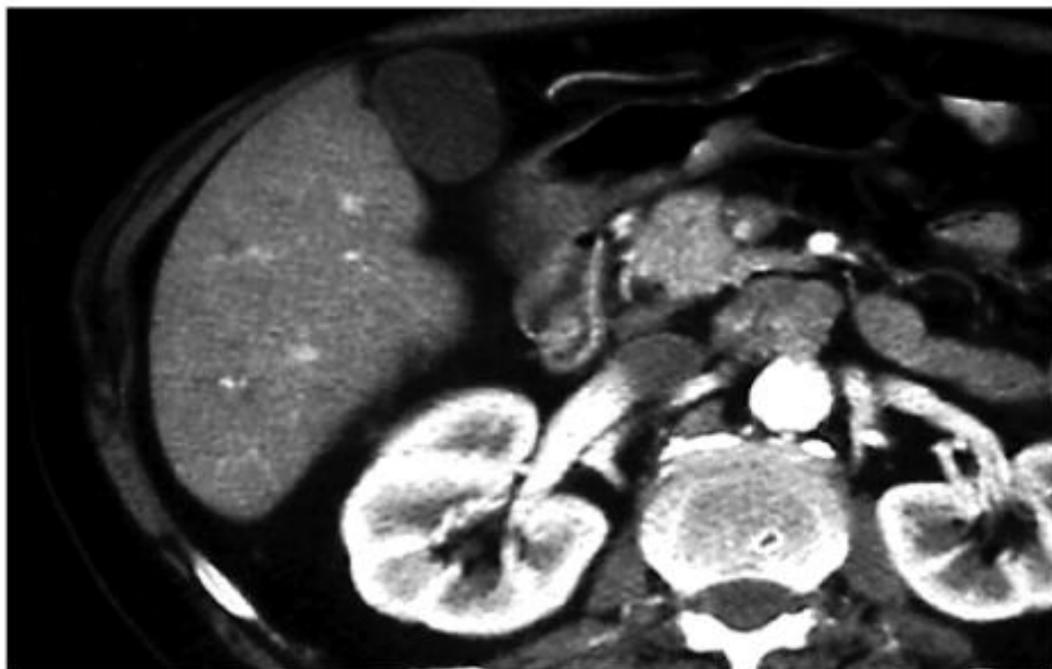
Spiral CT performed 6 months after treatment with SCDSF shows the shrinkage of portal thrombus and disappearance of HCC in the right lobe



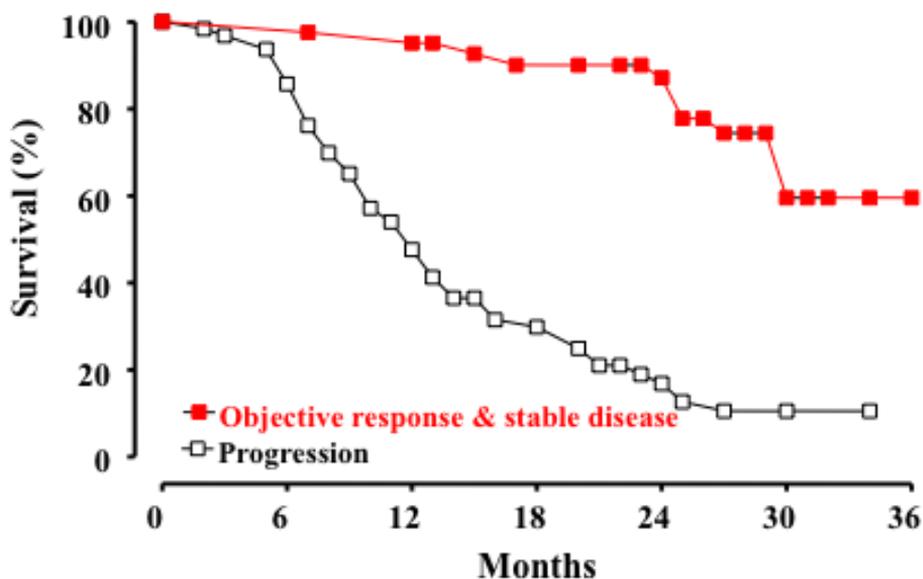
In another case, CT during arterial phase prior to treatment with SCDSF shows several nodules of HCC



CT performed 6 months after treatment with SCDSF shows the disappearance of neoplastic hypervascularization inside the nodules



Treatment with stem cell differentiation stage factors of intermediate-advanced HCC: an open randomized clinical trial.



Livraghi T, Meloni F, Frosi A et al. Oncol Res 2005

I risultati degli studi sperimentali sulla neurodegenerazione.

Una prima serie di esperimenti è stata condotta al fine di stabilire le condizioni sperimentali ottimali per la valutazione di una possibile attività di tipo neuroprotettivo degli estratti di zebrafish. A questo scopo, è stato verificato che il trattamento per 1h con NMDA 50 μ M inducesse una mortalità significativa nelle condizioni sperimentali studiate. Fettine ippocampali organotipiche sono state trattate per un'ora con NMDA 50 μ M, per avere una condizione che determini mortalità certa, e 24h dopo è stata condotta la colorazione con PI. Dopo fissazione, è stata acquisita l'area CA1 ed è stata analizzata la mortalità come descritto nei materiali e metodi. Il trattamento con NMDA 50 μ M determina un aumento di mortalità del 47% (NMDA 50 μ M vs controlli) nell'area CA1 dell'ippocampo 24h dopo il trattamento per 1h con NMDA (50 μ M). Sono state quindi valutate le proprietà neuroprotettive degli estratti in seguito ad esposizione di fettine organotipiche ippocampali a stimoli tossici diversi (deprivazione siero, NMDA 50 μ M; 1h). In una prima serie di esperimenti è stato analizzato il possibile effetto neuroprotettivo della miscela di estratti A (prelevato nello stadio di medio-blastula-gastrula dell'embrione di Zebrafish), B (prelevato nello stadio di 5 somiti), C

(prelevato nello stadio di 20 somiti). La miscela degli estratti è stata aggiunta (con un ulteriore diluizione 1:100) contemporaneamente al trattamento con NMDA o alla semplice deprivazione da siero e le analisi sono state condotte dopo 24 h. Il trattamento con la miscela ABC determina una significativa riduzione della mortalità neuronale ($-31,6 \pm 6,2\%$, $*p=0,005$) indotta da 1h di deprivazione da siero. Come già indicato il trattamento con NMDA ($50 \mu\text{M}$) causa un significativo aumento della mortalità nell'area CA1 ($**p=0,002$, NMDA $50 \mu\text{M}$ vs controlli); il cotrattamento con la miscela ABC determina una riduzione significativa della mortalità indotta da NMDA ($50 \mu\text{M}$) ($p=0,01$, NMDA $50 \mu\text{M}$ +ABC vs NMDA $50 \mu\text{M}$).

Successivamente, sono state valutate le eventuali proprietà neuroprotettive degli estratti somministrati singolarmente (A, B o C). Anche in questo caso, la mortalità neuronale tramite il saggio con propidio ioduro è stata valutata in seguito ad esposizione delle fettine organotipiche ippocampali a deprivazione di siero o a NMDA, in presenza dei diversi estratti di zebrafish. I singoli estratti hanno dimostrato una certa capacità neuroprotettiva, soprattutto l'estratto A, al limite della significatività, ma non diversa statisticamente rispetto ai controlli, né in seguito a deprivazione di siero né in seguito a trattamento con NMDA ($50 \mu\text{M}$).

I risultati degli studi clinici sulla psoriasi.

Due trials clinici (17,18) condotti per valutare l'efficacia in casi di psoriasi a seguito del trattamento con una crema per uso topico contenente, oltre agli estratti di Zebrafish, anche estratti di Boswellia serrata, acido 18-beta glicirretico, estratto di Zanthoxylum Alatum, 7-deidro- colesterolo, vitamina E, hanno dimostrato risultati clinici sovrapponibili: 80% di miglioramenti clinici, con riduzione dei fenomeni cheratosici, dell'eritema e del prurito. Detti miglioramenti sono comparsi dopo circa 20-30 giorni dall'inizio del trattamento con la crema applicata per tutto l'arco di tempo sopra-indicato.

Discussione e conclusioni

L'utilizzo dei fattori di differenziazione delle cellule staminali nella terapia antitumorale ha permesso di concepire un modello di cancro consistente con la realtà (19). In tale modello le cellule tumorali sono considerate cellule indifferenziate, mutate, bloccate in una fase di moltiplicazione compresa fra 2 stadi di differenziazione cellulare. Da questo punto di vista, pertanto, le cellule tumorali possono essere definite come "cellule staminali mutate", che, in rapporto al diverso grado di malignità, vengono considerate bloccate ad un diverso stadio di sviluppo. A sostegno di tale modello si può ricordare che in tumori con un grado di malignità

elevato, quali la leucemia linfoblastica acuta o mieloide acuta, vengono riscontrate cellule staminali multipotenti mutate, mentre in tumori a minore malignità, come la leucemia linfatica cronica, vengono riscontrate cellule non ancora completamente differenziate, ma in via di differenziazione definitiva. In accordo con tale visione, vengono ricordate le caratteristiche che accomunano le cellule tumorali a quelle staminali: le cellule tumorali presentano antigeni oncofetali, mantenuti durante la filogenesi, (20) e recettori specifici sulla membrana cellulare sui quali probabilmente agiscono i fattori di differenziazione delle cellule staminali. E' stato infatti già menzionato che tali fattori attivano pathways metabolici di differenziazione cellulare, che conducono la cellula a differenziarsi o a morire, come del resto avviene sull'embrione (gli eventi apoptotici nell'embrione sono numerosi).

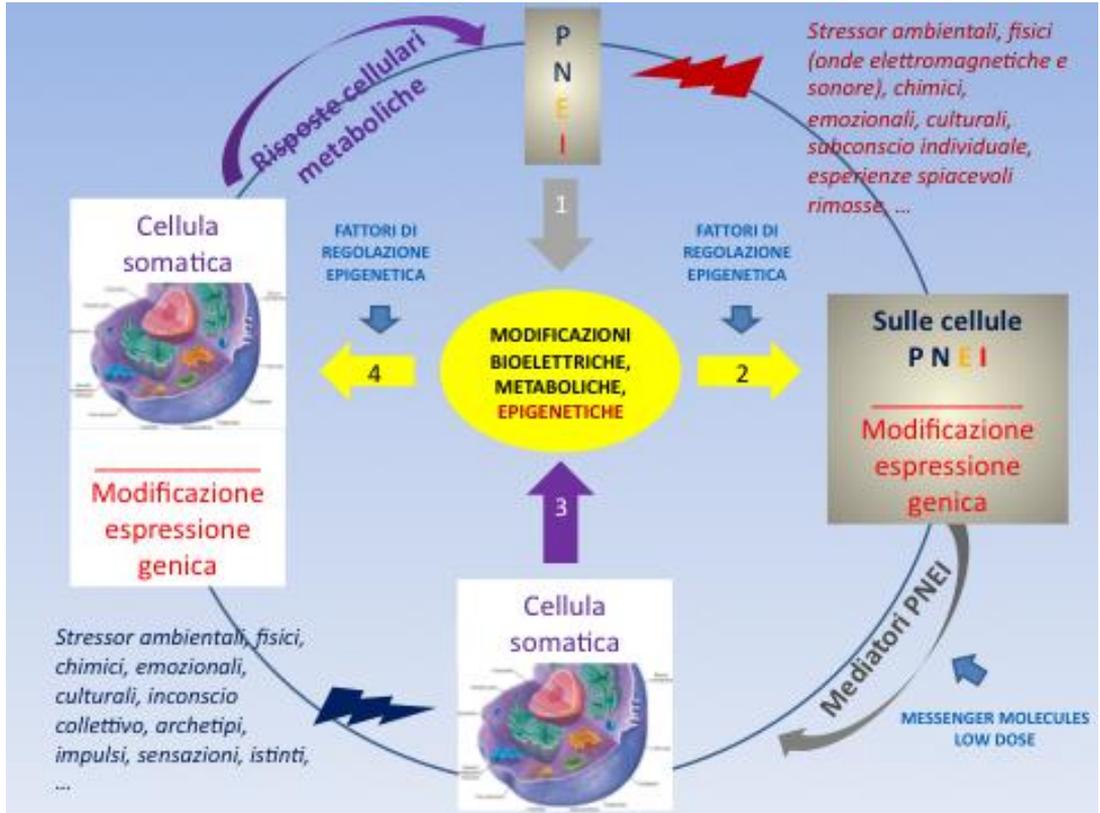
Inoltre le cellule tumorali e le cellule embrionali hanno pathways metabolici comuni: ad esempio APC/beta catenina/TCF/Wnt pathway ed il pathway Hedgehog/Smoothed/Patched. Il problema delle cellule tumorali è duplice: non solo presentano mutazioni genetiche, che sono all'origine della malignità, come noto da tempo, ma, cosa che è forse più importante, anche uno sbilanciamento del codice epigenetico. La configurazione genica ed il metabolismo delle cellule tumorali e' infatti molto simile a quella delle staminali: entrambe hanno attivi proto-oncogeni, producono fattori di crescita embrionali, presentano, come già sottolineato, antigeni onco-fetali, funzionano con un metabolismo anaerobico: la differenza fra cellule staminali e cellule tumorali consiste nel fatto che le cellule tumorali, a differenza delle staminali normali, per le mutazioni subite, non sono più in grado di completare il loro sviluppo e di differenziarsi. La correzione del codice epigenetico, attraverso la messa a disposizione dei fattori di differenziazione, fa rientrare le cellule tumorali nell'ambito della normale fisiologica, venendo by-passate le mutazioni, che sono alla base delle malignità. Quello che sta emergendo con sempre maggiore chiarezza è che il DNA regolatorio, che è preponderante rispetto a quello deputato, via RNA, alla traduzione di proteine, così come i microRNA, i fattori di trascrizione, e di regolazione traduzionali e post-traduzionali, hanno ruoli fondamentali nella regolazione del codice genetico. In altri termini quello che emerge con sempre maggiore evidenza è l'importanza del codice epigenetico nella regolazione della vita cellulare. In particolare e' il codice epigenetico a determinare il differenziamento cellulare, attivando e disattivando in modo specifico e selettivo, numerosi geni che fanno passare una cellula staminale da uno stato indifferenziato ad uno completamente differenziato. Nelle cellule tumorali questo codice e' completamente sbilanciato rispetto ad una cellula differenziata: tale codice nelle cellule maligne e' il medesimo di quello presente nelle cellule staminali. I fattori di differenziazione, oltre differenziare le cellule staminali normali, sono in grado di regolare in senso differenziativo anche le cellule tumorali, attraverso la repressione di geni della moltiplicazione e l'attivazione di nuovi pathway di differenziazione, by-passando così le mutazioni che sono all'origine della malignità. I nostri studi, che hanno comprovato quanto sopra

affermato, sono stati recentemente confermati da altre ricerche effettuate dai colleghi del Children Hospital di Chicago, che attualmente negli USA stanno destando notevole interesse (21). In particolare tali studi hanno confermato che il melanoma maligno reverte ad un fenotipo normale quando posto a contatto con il microambiente dell'embrione di Zebrafish. Ciò avviene perchè un morfogeno del sistema nervoso centrale dello Zebrafish, chiamato Nodal, riespresso nelle cellule del melanoma maligno e responsabile dell'aggressività del medesimo, viene represso da una frazione proteica a basso peso molecolare di 38 KDalton, chiamata Lefty, prodotta dalle cellule staminali dello stesso embrione di Zebrafish. Questa scoperta conferma pienamente tutti i nostri studi e contribuisce a consolidare un filone di ricerca, che può risultare di estrema importanza in campo terapeutico. D'altra parte negli ultimi anni vi è stato un numero crescente di ricerche che hanno evidenziato che la malignità dei tumori è legata alla presenza di cellule staminali tumorali (22), le quali, per altro, risultano essere resistenti alle terapie tradizionali, quali la chemio e radioterapia. Negli ultimi 4-5 anni i lavori scientifici sono così numerosi, che risulta impossibile menzionarli tutti. Qui si ricordano solamente le ricerche che dimostrano la presenza di cellule staminali tumorali nel glioblastoma (23, 24, 25), tumore della mammella (26, 27, 28, 29, 30, 31), del polmone (32, 33, 34, 35), della prostata (36, 37, 38), dell'ovaio (39, 40, 41, 42, 43), del fegato (44, 45, 46, 47, 48, 49), dello stomaco (50, 51, 52, 53, 54), del colon (55, 56, 57), del pancreas (58, 59, 60), del capo e del collo (61, 62, 63, 64). D'altra parte è noto da tempo che la malignità di molte malattie tumorali ematologiche è dovuta alla presenza di cellule staminali. Pertanto l'utilizzo dei fattori di differenziazione delle cellule staminali in oncologia rappresenta una terapia che possiamo definire "epigenetica", in grado di correggere le gravi alterazioni presenti nelle cellule tumorali, permettendo loro di ritornare ad un fenotipo normale. Anche per quanto riguarda l'interpretazione dei risultati conseguenti al trattamento con i fattori di differenziazione delle cellule staminali per la prevenzione della neurodegenerazione e per il trattamento della psoriasi, si possono addurre le stesse ragioni: i fattori di differenziazione sono dei regolatori epigenetici, che, da un lato, impediscono l'insorgere di fenomeni degenerativi e, dall'altro, regolano processi di alterata moltiplicazione cellulare, come avviene per esempio nella psoriasi, dove la moltiplicazione delle cellule dello strato basale epiteliale è di cinque volte superiore a quella che è considerata fisiologica: in questo caso abbiamo dimostrato che i fattori di differenziazione rallentano l'alterata moltiplicazione cellulare degli strati epidermici, normalizzandola (dati preliminari in via di conferma e non ancora pubblicati). È prevedibile che l'uso dei fattori di regolazione epigenetica possano avere un campo applicativo molto vasto nell'ambito della prevenzione o dei trattamenti di malattie degenerative, non solo del sistema nervoso, ma anche dell'apparato cardio-vascolare, osteo-articolare, diabete ecc., oltre che in medicina rigenerativa, come fattori anti-aging, migliorando le condizioni generali di salute delle persone anziane ed in particolare, con gli attuali prodotti per uso topico, migliorando le condizioni della cute. Gli studi condotti con tali fattori e

sommariamente ricordati in questo articolo, mi hanno portato a concepire un nuovo modello, che interpreta l'organismo umano come un sistema cognitivo mente-corpo, di cui vengono descritti tutti i pattern di regolazione dell'informazione. Di fatto il nuovo modello vede la persona umana come un sistema cognitivo complesso per interpretare il quale non basta neppure piu' la visione integrata dell'uomo portata avanti dalla Psiconeuroendocrinologia (PNEI). Quest'ultima ha avuto una notevole importanza nel chiarire e far comprendere molteplici meccanismi di adattamento e di comportamento dell'organismo umano nei confronti dell'ambiente. Purtroppo, alla luce delle nuove scoperte in campo bio-medico, l'impostazione basata sul modello PNEI non e' piu' sufficiente ad interpretare la complessita' dell'organismo umano e va quindi integrata nel piu' vasto modello che interpreta l'essere umano come un sistema informativo integrato mente-corpo. La figura sotto riportata illustra bene il nuovo modello di interpretazione del funzionamento della persona umana, integrando in esso il ruolo della PNEI. In tale modello sono riportati tutti i pattern di regolazione del sistema cognitivo mente-corpo, ovvero le regolarita' che portano allo sviluppo ed al mantenimento della vita. Il presente modello si differenzia da tutti gli altri per la sottolineatura del concetto di informazione, come determinante nel mantenere la vita. Risulta infatti evidente, da tutta la serie di esperimenti sopra ricordati, che i fattori di regolazione epigenetica sono essenzialmente dei fattori di regolazione dell'informazione, che circola nel sistema vivente e che mantengono la salute e l'integrita' del vivente. Essi mantengono l'ordine informativo, ovvero incrementano la neg-entropia (nota 1) e di conseguenza anche l'ordine strutturale del sistema. Risulta chiaro che nel sistema informativo qui presentato per equilibrio si intende non solo l'equilibrio energetico-termodinamico, ma l'equilibrio complessivo energetico-in-formazionale, che mantiene la vita. Quando insorge la malattia, si ha la perdita dell'ordine e della coerenza dipendenti dall'in-formazione significativa, che mantiene invece l'equilibrio dinamico neg-entropico. Un modello, che tenga conto solo dell'equilibrio termodinamico nel funzionamento dei sistemi viventi, come e' quello, ad esempio, di Prigogine, riesce a descrivere tutte le fasi attraverso le quali passa il sistema, ma non riesce cogliere la distinzione fra salute e malattia, fondamentale in campo biologico e medico, laddove deve essere posta in chiara evidenza l'importanza della descrizione dei diversi stati energetico-in-formazionali che possono mantenere gli organismi viventi nelle condizioni di salute o, al contrario, portarli alla malattia. In questa visione gli esseri viventi sono si' sistemi aperti, ma adattativi ed in equilibrio dinamico con l'ambiente, in virtu' dell'informazione che circola istantaneamente in tutto il sistema, la quale determina l'adattabilita' all'ambiente esterno. Solo quando si ha la malattia, si ha la perdita dell'equilibrio: allora il sistema aperto, si allontana dall'equilibrio, avendo perso la neg-entropia, ovvero l'ordine dipendente dall'informazione significativa, che mantiene invece l'equilibrio dinamico neg-entropico. Tenendo conto di tutte le considerazioni fatte sopra, volendoci riferire alla persona umana, si puo' presentare il modello sottoriportato, in cui vengono descritti tutti i patterns e gli steps regolativi

dell'informazione circolare, istantanea, che mantiene l'equilibrio dinamico, che dà luogo alla vita e mantiene la salute. Tale modello olistico potrebbe pertanto essere definito come "OLOPATTERN DEL SISTEMA COGNITIVO MENTE-CORPO".

OLOPATTERN DEL SISTEMA COGNITIVO MENTE-CORPO.



In questo modello viene descritto come informazioni ambientali di natura fisica, quali onde elettromagnetiche di tutte le frequenze, da quelle piu' elevate come i raggi gamma o X, fino ad arrivare alle onde radio, altre informazioni di natura fisica, quali le onde sonore, oppure di natura chimica, compresi gli stimoli causati da agenti tossici e patogeni, stimoli emozionali, derivanti dai nostri vissuti individuali, compresi quelli derivanti dall'inconscio individuale, dove vengono celate accuratamente le esperienze spiacevoli rimosse, stimoli mentali derivanti dalla nostra specifica visione culturale ecc. influenzino il sistema PNEI, provocando nelle cellule che costituiscono tale sistema, modificazioni bioelettriche, metaboliche

ed epigenetiche, ovvero tutto il network informativo in grado di regolare l'espressione genica, di dirigere cioè il processo decisionale che stabilisce quali geni debbano essere attivati e quali disattivati. A seguito di tali modificazioni i diversi geni attivati portano alla sintesi di varie proteine, che a loro volta portano alla produzione dei mediatori del sistema PNEI, che sono ben conosciuti. Detti mediatori del sistema PNEI agiscono a livello delle cellule somatiche, che costituiscono la restante parte del corpo non compreso nel sistema PNEI, sulle quali riversano il loro contenuto informativo. Ma su tali cellule somatiche a loro volta agiscono molte altre informazioni, che sono ancora una volta di natura fisica, chimica, emozionale, culturale, stimoli legati all'inconscio collettivo, che è quella parte dell'inconscio evoluto dal punto di vista filogenetico e rappresentato da quelli che Jung definisce archetipi, oltre che da impulsi, sensazioni, istinti, pulsioni sessuali, comuni a tutti gli individui e diversi dall'inconscio individuale legato alle specifiche esperienze personali: tali archetipi hanno grande importanza nel determinare le risposte delle cellule somatiche. Queste, sotto l'azione di tutti gli stimoli sopra elencati, ovvero delle informazioni menzionate, vanno incontro a modificazioni bioelettriche, metaboliche, epigenetiche, le quali provocano modificazioni dell'espressione genica, che porta le cellule somatiche a produrre molte diverse molecole a loro volta recanti precise informazioni, che agiscono sul sistema PNEI, incidendo così nuovamente sulle risposte di quest'ultimo. Pertanto il sistema adattativo cognitivo mente-corpo funziona come un'unità inscindibile, in cui le informazioni agiscono in modo circolare, provenendo dalla mente, riflettendosi sul corpo, modificando le risposte corporee, sulle quali a loro volta agiscono ulteriori stimoli con contenuti informativi, che producono altre modificazioni. Tutte queste modificazioni che agiscono sulle cellule somatiche a loro volta influenzano il sistema in grado di originare fenomeni mentali e si ricomincia così da capo. Pertanto l'equilibrio di un organismo risulta essere un processo che si rinnova continuamente e che è mantenuto da un'organizzazione dell'informazione estremamente coerente, che circola continuamente ed in modo istantaneo in tutto il sistema e che permette l'esprimersi di quel fenomeno complesso che chiamiamo vita.

Nota 1 La teoria dell'informazione deriva dalla confluenza di due teorie: 1) la teoria delle comunicazioni elettriche e 2) la teoria della termodinamica. C. Shannon è riuscito a mettere insieme le due teorie ed a legare fra di loro il concetto di informazione e di entropia. La misura dell'informazione, valutata in termini puramente fisici, si è rivelata corrispondente all'equazione dell'entropia, uguale ma di segno opposto e definita neg-entropia. L'aumento della neg-entropia corrisponde pertanto ad un incremento di ordine e di organizzazione di un sistema.

Ringraziamenti: Ringrazio il Dott. Alessandro Pizzoccaro, il quale a seguito dell'illustrazione del modello del Sistema Cognitivo Mente-Corpo, che avevo fatto all'ultimo convegno AIOT di Milano, aveva suggerito il nome di OLOPATTERN per caratterizzare meglio tale modello. Il nome mi e' sembrato appropriato e sintetico: da qui la dizione: "Olopattern del Sistema Cognitivo Mente-Corpo".

Bibliografia

- 1) Einhorn, L. Are there factors preventing cancer development during embryonic life? *Oncodev. Biol. Med.*, 1982, 4, 219-229.
- 2) Lakshmi, M.S.; Sherbet, G.V. *Embryonic and Tumor Cell Interactions*. Karger Basel, 1974, 380-399.
- 3) Brent, R.L. *Radiation Teratogenesis*. *Teratology*, 1980, 21, 281-298.
- 4) Pierce, G.B. The cancer cell and its control by the embryo. *Am. J. Pathol.*, 1983, 113, 116-124.
- 5) Yu, C-L.; Tsai, M.H. Fetal fetuin selectively induces apoptosis in cancer cell lines and shows anti-cancer activity in tumor animal models. *Cancer Letter*, 2001, 166:173/184.
- 6) Papaioannou, V.E.; McBurney, M.V.; Gardner, R.L.; Evans, R.L. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*, 1975, 258, 70-73.
- 7) Topczewska, J.M.; Postovit, L.M.; Margaryan, N.V. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nature Med.*, 2006, 12 (8): 925-932
- 8) Kulesa, P.M.; Kasermeier-Kulesa, J.C.; Teddy, J.M.; Margaryan, N.V.; Seftor, E.A.; Hendrix, M.J. Reprogramming metastatic tumor cells to assume a neural crest like phenotype in a embryonic microenvironment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 3752-3757.
- 9) Gardoni F, Bellone C, Viviani B, Marinovich M, Meli E, Pellegrini-

Giampietro DE, Cattabeni F, Di Luca M. Lack of PSD-95 drives hippocampal neuronal cell death through activation of an alpha CaMKII transduction pathway.

Eur J Neurosci. 2002 Sep;16(5):777-86.

- 10) Pellegrini-Giampietro DE, Cozzi A, Peruginelli F, Leonardi P, Meli E, Pellicciari R, Moroni F. 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)-2-(3'-carboxybicyclo[1.1.1] pentyl)-glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in in vitro and in vivo models of cerebral ischaemia. Eur J Neurosci. 1999 Oct;11(10):3637-47.
- 11) Biava, P.M.; Bonsignorio, D.; Hoxa, M. Cell proliferation curves of different human tumor lines after in vitro treatment with Zebrafish embryonic extracts. J.Tumor Marker Oncol., 2001, 16 195-202.
- 12) Biava, P.M.; Carluccio, A. Activation of anti-oncogene p53 produced by embryonic extracts in vitro tumor cells. J. Tumor Marker Oncol., 1977, 12, 9-15.
- 13) Biava, P.M.; Bonsignorio, D.; Hoxa, M.; Facco, R.; Ielapi, T.; Frati, L.; Bizzarri, M. Post-traslational modification of the retinoblastoma protein (pRb) induced by in vitro administration of Zebrafish embryonic extracts on human kidney adenocarcinoma cell line. J. Tumor Marker Oncol., 2002, 17(2); 59-64.
- 14) Cucina, A.; Biava, P.M.; D'Anselmi, F.; Coluccia, P.; Conti, F.; Di Clemente, R.; Miccheli, A.; Frati, L.; Gulino, A.; Bizzarri, M. Zebrafish embryo proteins induce apoptosis in human colon cancer cells (Caco2). Apoptosis, 2006, 9, 1617-1628.
- 15) Livraghi, T.; Meloni, F.; Frosi, A.; Lazzaroni, S.; Bizzarri, M.; Frati, L.; Biava, P.M. Treatment with stem cell differentiation stage factors of intermediate-advanced hepatocellular carcinoma: an open randomized clinical trial. Oncol Res., 2005, 15 (7,8): 399-408.
- 16) Livraghi et. al. in special issue " Reprogramming of Normal and Cancer Stem Cells" P.M. Biava Guest Editor, Current Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 12 N.2 febbraio 2011: 254-260.
- 17) Di Pierro F., Negri M., Bollero C. Terapia della psoriasi. Efficacia clinica di un preparato multicomponente. Cosmetic Technology., 2009, 12 (2): 13-17
- 18) Harak H., Frosi A., Biava P.M. Studio clinico sull'efficacia e tollerabilita' di una crema per uso topico nel trattamento della psoriasi. La Medicina Biologica.....
- 19) Biava, P.M.; Bonsignorio, D. Cancer and cell differentiation: a model to explain malignancy. 2002, 17(3): 47-54

- 20) Biava P.M, Monguzzi A, Bonsignorio D, Frosi A, Sell S, Klavins JV. Xenopus Laevis Embryos share antigens with Zebrafish Embryos and with human malignant neoplasms. *J. Tumor Marker Oncol.* 2001, 16; 203-206
- 21) Postovit, L.M.; Maragaryan, N.V.; Seftor, E.A. Human embryonic stem cell microenvironment suppress the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 2008, 18: 105-111.
- 22) Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weisman, I.L. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414(6859), 105-111.
- 23) Sato, A.; Sakurada, K.; Kumabe, T.; Sasajima, T.; Beppu, T.; Azano, K.; Ohkuma, H.; Ogawa, A.; Mizoi, K.; Tominaga, T.; Kitanaka, C.; Kayama, T. Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastoma. *Neurosurg. Rev.*, 2010, 33(2), 175-183.
- 24) Di Tommaso, T.; Mazzoleni, S.; Wang, E.; Sovena, G.; Claverna, D.; Franzin, A.; Mortini, P.; Ferrone, S.; Doglioni, C.; Marincola, F.M.; Galli, R.; Parmiani, G.; Maccalli, M. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16(3)800-813.
- 25) Ji, J.; Black, K.C.; Yu, J.S. Glioma stem cell research for the development of immunotherapy. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 2010, 21(1). 159-166.
- 26) Chen, J.; Chen, Z.L. Technology update for the sorting and identification of breast cancer stem cells. *Chin. J. Cancer*, 2010, 29 (3), 265-269.
- 27) Roesler, R.; Cornelio, D.B.; Abujama, A.L.; Schwartzmann, G. HER2 as a cancer stem-cell target. *Lancet Oncol.*, 2010, 11(3), 225-226.
- 28) Wu, W. Patents related to cancer stem cell research. *Recent Pat. DNA Gene Seq.*, 2010, 4(1) 40-45.
- 29) Park, S.Y.; Lee, H.E.; Li, H.; Shipitsin, M.; Gelman, R.; Polyak, K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Cancer Res.*, 2010, 16(3), 876-887.
- 30) Lawson, J.C.; Blatch, G.L.; Ekins, A.L. Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Cancer Res. Treat.*, 2009, 8(2), 241-254.
- 31) Luo, J.; Yin, X.; Ma, T.; Lu, J. Stem cells in normal mammary gland and breast cancer. *Am. J. Med. Sci.*, 2010, 339(4), 366-370.
- 32) Spiro, S.G.; Tanner, N.T.; Silvestri, G.A.; James, S.M.; Lim, E.; Vansteenkiste, J.F.; Pirker, R. Lung cancer: progress in diagnosis staging and therapy. *Respirolog*, 2010, 15(1), 44-50.
- 33) Gorelik, E.; Lokshin, A.; Levina, L. Lung cancer stem cells as target for therapy. *Anticancer Agents Med. Chem*, 2010, 10(2), 164-171.
- 34) Sullivan, J.P.; Minna, J.D.; Shay, J.W. Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29(1) 61-72.
- 35) Westhoff, B.; Colaluca, I.N.; D'Ario, G.; Donzelli, M.; Tosoni, D.; Volorio, G.; Pelosi, G.; Spaggiari, L.; Mazzarol, G.; Viale, G.; Pece, S.; Di Fiore, P.P.

- Alteration of the Notch pathway in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 87(3) 457-466.
- 36) Lawson, Da.; Zong, Y.; Memarzadeh, S.; Xin, L.; Huang, J.; Witte, ON. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107(6), 2610-2615.
 - 37) Lang, S.H.; Anderson, E.; Fordham, R.; Collin, A.T. Modeling the prostate stem cell niche : an evaluation of stem cell survival and expansion in vitro. *Stem Cells Rev.*, 2010, 19(4), 537-546.
 - 38) Joung, J.Y.; Cho, K.S.; Kim, J.E.; Seo, H.K.; Ching, J.; Park, W.S.; Choi, M.K.; Lee, K.H. Prostate stem cell antigen mRNA in peripheral blood as a potential predictor of biochemical recurrence of metastatic prostate cancer. *J. Surg. Onc.*, 2010, 101(2), 145-148.
 - 39) Liu, T.; Cheng, W.; Lai, D.; Huang, Y.; Guo, L. Characterization of primary ovarian cancer cells in different culture systems. *Oncol. Rep.*, 2010, 23(5), 1277-1284.
 - 40) Fong, My.; Kakar, S.S. The role of cancer stem cells and the side population in epithelial ovarian cancer. *Histol. Histopatol*, 2010, 25(1), 113-120.
 - 41) Murphy, S.K. Targeting ovarian cancer initiating cells. *Anticancer Agents*, 2010, 10(2), 157-163.
 - 42) Pen, S.; Maihle, N.J.; Huang, Y. Pluripotency factors Lin 28 and Oct 4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. *Oncogene*, 2010, 29(14), 2153-2159.
 - 43) Kusumbe, A.P.; Bapat, SA. Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy. *Cancer Res.*, 2009, 69(24) 9245-9253.
 - 44) Tomuleasa, C.; Soritau, O.; Rus-Ciucu, D.; Pop, T.; Todea, D.; Mosteanu, O.; Pintea, B.; Foris, V.; Susman, S.; Kacso, G.; Irimie, A. Isolation and characterization of hepatic cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointestin. Liver Dis.*, 2010, 19(1), 61-67.
 - 45) Zou, G.M. Liver cancer stem cells as an important target in liver cancer therapies. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2010, 10(2), 172-175.
 - 46) Lee, T.K.; Castilho, A.; Ma, S.; Ng, I.O. I. Liver cancer stem cells: implication for new therapeutic target. *Liver Intern.* 2009, 29(5), 955-965.
 - 47) Marquardt, J.U.; Thorgeirsson, S.S. Stem Cells in hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data. *Semin Liver Dis.*, 2010, 30(1), 26-34.
 - 48) Kung, J.W.; Currie, I.S.; Forbes, S.J.; Ross, J.A. Liver development, regeneration, and carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, 30(1), 26-34.
 - 49) Gai, H.; Nguyen, D.M.; Moon, Y.J.; Aguila, J.R.; Fink, L.M.; Ward, D.C.; Ma, Y. Generation of murine hepatic lineage cells from induced pluripotent stem cells. *Differentiation*, 2010, 79(3) 171-181.
 - 50) Correia, M.; Machado, J.C.; Ristimaki, A. Basic aspects of gastric cancer. *Helicobacter*, 2009, 14(1), 36-40.

- 51) Takaishi, S.; Okumura, T.; Tu, S.; Wang, S.S.; Shibata, W.; Vigneshwaran, R.; Gordon, S.A.; Shimada, Y.; Wang, T.C. Identification of gastric cancer stem cells using the surface marker CD44. *Stem Cells*, 2009, 59(5), 106-120.
- 52) Nishii, T.; Yashiro, M.; Shinto, O.; Sawada, T.; Ohira, M.; Hirakawa, K. Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma. *Cancer Sci.*, 2009, 100(8), 1397-1402.
- 53) Chen, Z.; Xu, W.R.; Quian, H.; Zhu, W.; Bu, X.F.; Wang, S.; Yan, Y.M.; Mao, F.; Gu, H.B.; Cao, H.L.; Xu, X.J. Oct4 a novel marker for human gastric cancer. *J. Surg. Oncol.*, 2009, 34(5), 1201-1207.
- 54) Kang, D.H.; Han, M.E.; Song, M.H.; Lee, Y.S.; Kim, E.H.; Kim, H.J.; Kim, G.H.; Kim, D.H.; Yoon, S.; Baek, S.Y.; Kim, B.S.; Kim, G.B.; Oh, S.O. The role of hedgehog signaling during gastric regeneration. *J. Gastroenterol.*, 2009, 44(5), 372-379.
- 55) Yeung, T.M.; Ghandhi, S.C.; Wilding, J.L.; Muschel, R.; Bodmer, W.F. Cancer stem cells from colorectal cancer derived cell lines. *Proc. Natl. Sci. USA*, 2010, 107(8), 3722-3727.
- 56) Gulino, A.; Ferretti, E.; De Smaele, E. Hedgehog signaling in colon cancer and stem cells. *EMBO*, 2009, 1(6-7) 300-302.
- 57) Thenappen, A.; Li, Y.; Shetty, K.; Johnson, L.; Reddy, E.P.; Mishra, L. New therapeutic targeting colon cancer stem cells. *Curr. Colorectal Cancer, Rep.*, 2009, 5(4), 209.
- 58) Rasheed, Z.A.; Yang, J.; Wang, Q.; Kowalski, J.; Freed, I.; Murter, C.; Hong, S.M.; Koorstra, J.B.; Rajeshkumar, N.V.; He, X.; Goggins, M.; Iacobuzio-Donahue, C.; Berman, D.M.; Laheru, D.; Jimeno, A.; Hidalgo, M.; Maitra, A.; Matsui, W. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2010, 102(5), 340-351.
- 59) Puri, S.; Hebrok, J. Cellular plasticity within pancreas-lessons learned from development. *Dev. Cell.*, 2010, 18(3), 342-356.
- 60) Quante, M.; Wang, T.C.; Stem cells in gastroenterology and hepatology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, 6(12), 724-737.
- 61) Ailles, L.; Prince, M. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods Mol. Biol.*, 2009, 568, 175-193.
- 62) Zhang, P.; Zhang, Y.; Mao, L.; Zhang, Z.; Chen, W. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotype. *Cancer Lett.*, 2009, 277(2), 227-234.
- 63) Brunner M.; Thurnher, D.; Heiduschka, G.; Grasl, MCh.; Brostjan, C.; Erovic, B.M. Elevated levels of circulating endothelial progenitor cells in head and neck cancer patients. *J. Surg. Oncol.*, 2008, 98(7), 545-550.
- 64) Zhang, Q.; Shi, S.; Yen, Y.; Brown, J.; Ta, J.Q.; Le, A.D. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.*, 2010, 289(29), 151-160.

