ALLESTIMENTO DI COLTURE PRIMARIE

Ad oggi, la possibilità di accedere a linee cellulari stabili è il principale limite per la ricerca sui cordomi e lo sviluppo di trattamenti efficaci.

Ci siamo quindi proposti di derivare delle linee cellulari dai campioni chirurgici inviati a fresco.

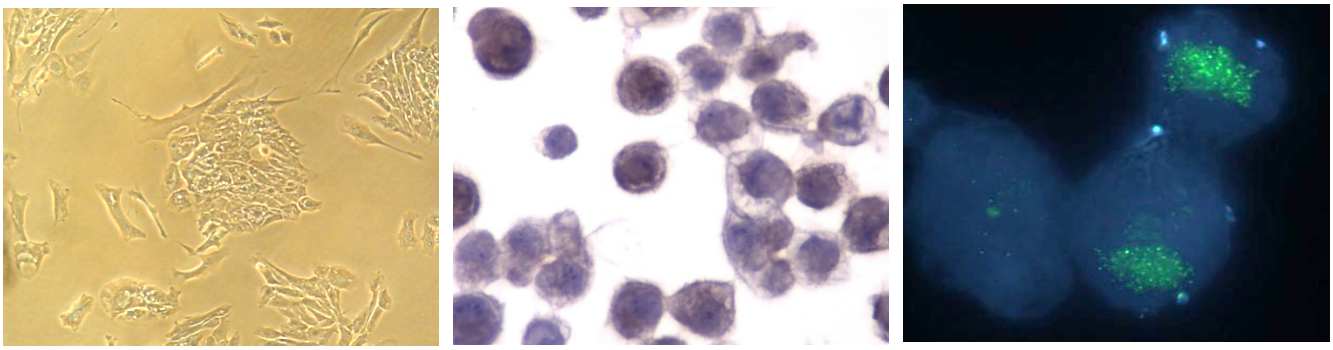
Immediatamente dopo l'asportazione chirurgica, il tessuto viene lavato con della soluzione fisiologica contenente antibiotici sotto cappa a flusso laminare. Successivamente si procede con la disgregazione meccanica e successiva disgregazione enzimatica. Le cellule vengono seminate in capsule di Petri in terreno di Iscove/RPMI 4:1 addizionato di Penicillina 100 U/ml, Streptomicina 100 µg/ml, amminoacidi non essenziali, Fetal Bovine Serum 10% e FGF 20 ng/ml.

Ad oggi abbiamo ottenuto una linea da un campione di cordoma del clivus.

L'analisi istologica del tessuto di partenza ha confermato la presenza di cellule a profilo poligonale con nucleo tondeggiante, cromatina fine, membrana citoplasmatica ben definita e citoplasma chiaro o finemente granulare, anche con microvacuolizzazioni (cellule fisalifere). E' stata inoltre confermata la Positività per i marcatori Brachyury ed EMA, negatività per PTEN. Il quadro morfologico ed immunofenotipico è compatibile con diagnosi di cordoma con aree a differenziazione condroide.

Le cellule mantenute *in vitro* mostrano una crescita piuttosto lenta, ma costante, pari a circa 1,5 PDL/mese, in linea con i dati pubblicati relativi alle poche colture di cordoma ad oggi disponibili. La presenza di FGF 20 ng/ml nel terreno di coltura è un elemento che favorisce la crescita della linea.

Il mantenimento dell'espressione di Brachyury nei diversi passaggi di coltura è stato confermato mediante analisi in qRT-PCR e colorazione immunoistochimica ed in immunofluorescenza.



Microscopio luce diretta; colorazione immunoistochimica per Brachyury (DAB/Ematossilina); colorazione in immunofluorescenza per Brachyury (Alexa Green/CellBrite)

L'analisi tramite metodica FISH ha mostrato una popolazione cellulare eterogenea che presenta una perdita di omozigosi per il gene che codifica per PTEN o una delezione del cromosoma 10. Questo aspetto sarà ulteriormente approfondito mediante analisi molecolari.

Una volta terminata la caratterizzazione della linea, è nostra intenzione sottoporre i nostri risultati alla Chordoma Foundation, la quale, insieme ad ATCC, si è prefissata lo scopo di creare una banca di linee cellulari di cordoma per dare una spinta alla ricerca su questo tipo di tumore raro.