

UNIVERSITA' DEL PIEMONTE ORIENTALE

"A. AVOGADRO"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Dottorato in Medicina Molecolare

Dr. Valentina Piffanelli

*Relazione II anno*

INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA DELLE VIE APOPTOTICHE IN

DIVERSI TIPI DI MENINGIOMA

# INTRODUZIONE

## LE MENINGI

L'encefalo e il midollo spinale sono avvolti da tre membrane connettivali, dette meningi. La più esterna, di struttura fibrosa e resistente, è detta dura madre (pachimeninge), all'interno di questa si ha la leptomeninge, costituita dall'esterno verso l'interno da due sottili membrane: l'aracnoide e la pia madre. L'aracnoide è separata dalla dura madre da uno spazio virtuale o spazio sottodurale. La pia madre aderisce alla sostanza nervosa, sia in corrispondenza dell'encefalo, sia in corrispondenza del midollo spinale. L'aracnoide e la pia madre sono separate da uno spazio detto spazio sottoaracnoideale o infraaracnoideale, nel quale è contenuto il liquido cefalo-rachidiano.

L'aspetto clinico più rivelante delle meningi è rappresentato dalle forme neoplastiche che prendono il nome di meningiomi. Questi originano dalle cellule aracnoidali delle meningi e rappresentano il 20 - 33 % di tutti i tumori cerebrali.

La veduta più accreditata considera il meningioma derivato da propaggini aracnoidee entro i seni durali o nelle vene affluenti a quest'ultime. Da una veduta del genere trae motivo la concezione restrittiva secondo cui i meningiomi originerebbero non da cellule connettivali qualsiasi delle meningi, ma dal meningotelio, cioè dagli elementi di rivestimento dell'aracnoide i quali sarebbero responsabili delle particolarità morfo-biologiche di questi tumori.

I meningiomi si sviluppano in sedi varie, sebbene prediligano la cavità cranica, dove la loro frequenza è in media del 14% rispetto a tutti gli altri tumori primitivi ivi originanti. Più frequentemente ha origine lungo il seno sagittale e sulla convessità cerebrale. La comparsa della sintomatologia è legata essenzialmente a fenomeni di compressione del tessuto cerebrale e dei nervi cranici, e varia in rapporto alla regione di insorgenza.

Ricerche recenti suggeriscono che tanto i traumi cranici quanto le radiazioni ionizzanti possono essere considerati fattori di rischio nella genesi dei meningiomi. Inoltre è stata segnalata l'origine ereditaria dei meningiomi multipli che si associano alla neurofibromatosi di tipo 2, affezione autosomica dominante con locus nel cromosoma 22. I caratteri macroscopici dei meningiomi sono variabili: a volte emisferici o francamente sferici, possono arrivare ad essere essere allungati e peduncolati. La loro superficie esterna è liscia o lobulata. Soprattutto in superficie di sezione i meningiomi mostrano un comportamento variabile in relazione alla loro struttura microscopica.

Per i meningiomi esiste una classificazione in accordo con l'organizzazione mondiale della sanità (WHO) che identifica in tre gruppi la totalità di tutte le tipologie di meningiomi denominate grado I, grado II e grado III ( Kleihues et al., 1993; Perry et al., 1997).

La classificazione dei meningiomi in questa nomenclatura definisce il grado di invasività (anaplasticità), che va dal grado I considerato a bassa proliferazione e non invasivo, al grado che tipicamente rappresenta le situazioni di meningiomi invasivi (maligni nella denominazione corrente)(Perry et al, 1997). Istologicamente, si possono presentare quindi forme benigne e maligne. L'elevata percentuale di operabilità ha fatto considerare spesso il meningioma come una forma relativamente benigna, ma nella maggior parte dei casi tale valutazione è eccessivamente ottimistica, anche a causa della sistematica tendenza del tumore alla recidività locale.

Dal punto di vista istologico molti dei meningiomi sono differenziati, hanno bassa capacità proliferativa e mostrano limitati segni di invasività. Gli aspetti anaplastici e gli altri segni di invasività riguardano un numero più ristretto di casi.

La classificazione attualmente accettata riconosce le seguenti tipologie di meningiomi:

**Tipo sinciziale.** Deve la sua denominazione al fatto che le cellule poligonali che lo costituiscono, non hanno limiti netti, ma formano come un ampio sincizio.

**Tipo transizionale o di transizione.** Insieme al precedente costituisce il tipo avente più

alta incidenza. Gli elementi costitutivi sono allungati, fusiformi e distribuiti in modo da dare origine a figure a vortice o concentriche attorno a piccoli vasi.

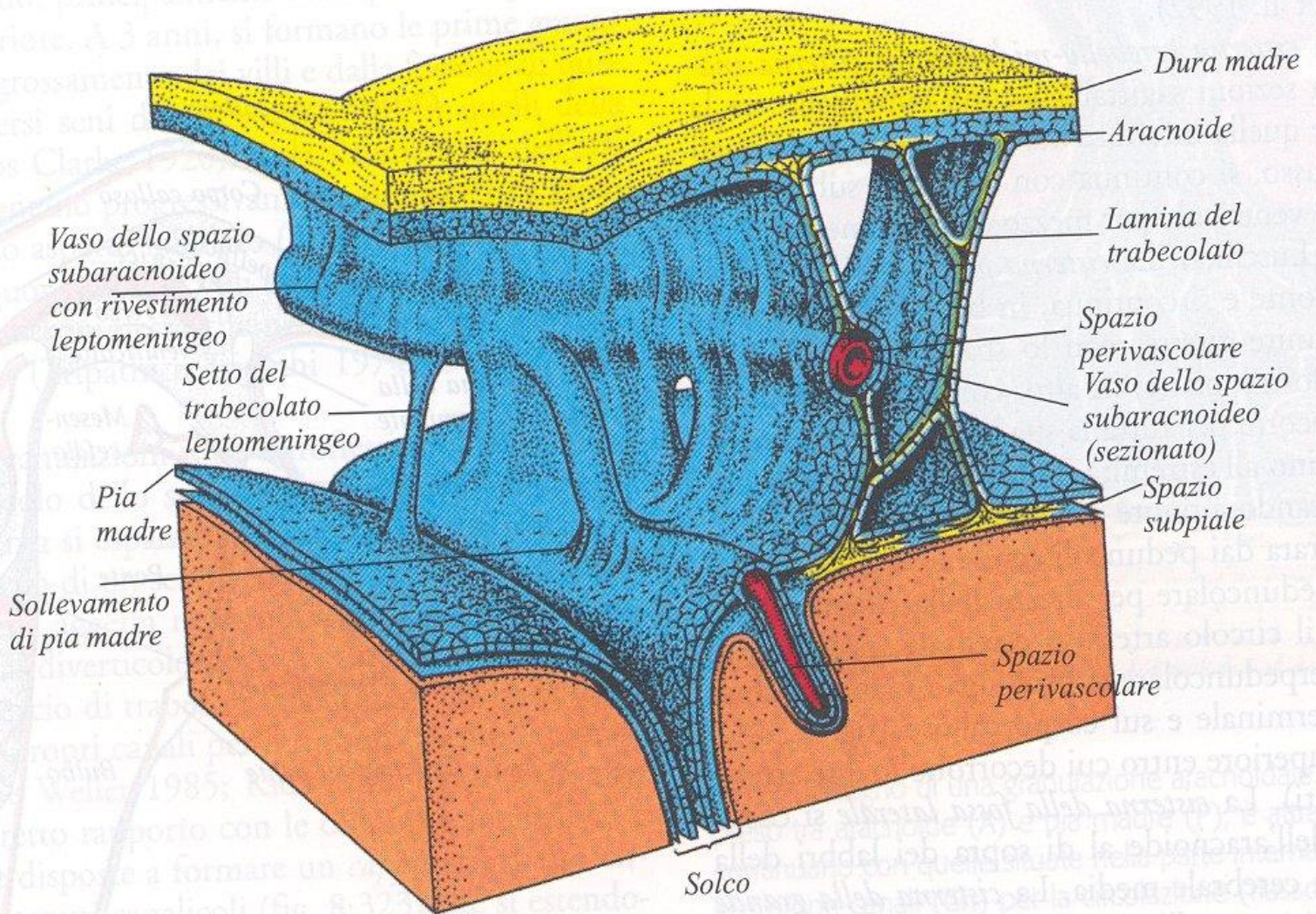
**Tipo fibroso.** A somiglianza del precedente consta di elementi allungati, fusiformi con nucleo a biscotto, i quali, tuttavia, formano meno frequentemente strutture vorticose. Il riscontro che contraddistingue il presente oncotipo è l'elevata quota di fibre argentofile e collagene che s'interpongono tra le cellule. Ne deriva una consistenza particolarmente elevata.

**Tipo angioblastico.** Risulta di cavità vascolari rivestite da cellule rigonfie. Queste si espandono nel lume che può risultarne più o meno obliterato.

All'individuazione di questo tipo di tumore viene oggi conferito particolare significato clinico, essendogli riscontrata tendenza verso rapide recidive e metastatizzazione a distanza.

**Tipo meningoteliale.** Nelle classiche e comuni varianti, le cellule tumorali formano lobuli che sono circondati da sottili setti di collagene. Dentro i lobuli le cellule tumorali appaiono a forma di sincizio poiché gli intricati e intrecciati processi delle cellule tumorali non possono essere distinti al microscopio.

**Tipo atipico e anaplastico.** Alcuni considerano l'invasività del tessuto cerebrale un marchio del meningioma anaplastico, ma questo può anche verificarsi in altri classici tumori. Molti autori concordano che le caratteristiche istologiche preoccupanti del tumore sono: mitosi frequenti, regioni di ipercellularità, piccole cellule con alto rapporto nuclei/citoplasma e/o prominenti nucleoli, crescita senza schema o a strati, necrosi, struttura papillare e invasione del tessuto cerebrale.



**Fig 1. Struttura delle meningi**

## APOPTOSI

L'apoptosi costituisce il carattere morfologico più tipico della morte cellulare programmata ed è associato a caratteristiche modificazioni morfologiche e biochimiche. Il nucleo di una cellula apoptotica si condensa, la cellula si frammenta in corpi apoptotici che vengono rapidamente fagocitati dai macrofagi e dalle cellule vicine. Al contrario, nei fenomeni di morte per necrosi, le cellule si rigonfiano e scoppiano, riversando nell'ambiente circostante il loro contenuto, provocando l'innesto della risposta infiammatoria.

L'apoptosi svolge un ruolo molto importante nella vita di ogni organismo, sia nel corso dell'embriogenesi, per eliminare le cellule in eccesso (ad esempio nel sistema nervoso centrale) (Salvesen and Dixit, 1997), sia nell'età adulta, per mantenere un numero costante di cellule (omeostasi) e per eliminare cellule invecchiate o danneggiate.

L'apoptosi può essere indotta da stimoli esterni (quali ipertermia, radiazioni ionizzanti, ormoni corticosurrenalici), dalla mancanza di fattori di crescita e dall'assenza di adesione delle cellule ad una specifica matrice extracellulare ("anoikis"). Le cellule apoptotiche hanno caratteristiche morfologiche ben definite. Nella fase iniziale del fenomeno apoptotico, la cellula tende ad assumere una forma rotondeggiante e a staccarsi dalle cellule vicine, presentando discontinuità nelle giunzioni intercellulari. Contemporaneamente il citoplasma si condensa e il reticolo endoplasmatico si dilata fino a formare delle vescicole che si fondono con la membrana plasmatica, mentre la morfologia dei mitocondri rimane invariata. La cromatina si aggrega in masserelle semilunari alla periferia del nucleo ed il nucleolo si frammenta; successivamente compaiono invaginazioni della membrana nucleare che provocano la segmentazione del nucleo. Infine profonde incisioni della membrana plasmatica fendono il citoplasma e la cellula si suddivide in frammenti rotondeggianti di diverse dimensioni, chiamati "corpi

apoptotici", che spesso contengono mitocondri ed altri organelli ben conservati. Nella cellula che entra in apoptosi si distinguono due eventi: l'attivazione di endonucleasi responsabili della scissione della cromatina e l'esposizione in membrana di marcatori glucidici che rendono riconoscibili i corpi apoptotici alle cellule che li fagocitano.

Per l'attivazione e lo svolgimento del processo apoptotico si è dimostrata necessaria la presenza di una proteina animale che ha il suo omologo nell'ICE umano (interleukin-1 $\beta$  Convertine Enzime).

L'ICE e le altre cisteinproteasi in grado di tagliare un substrato proteico sono state denominate **casпси** (cisteine-dependent aspartate-specific-proteases); attualmente la ricerca ha identificato quattordici tipi di casпси riconducibili a tre classi in base alle similitudini strutturali e al tipo di azione che inducono (Patel et al., 1996).

Le casпси sono enzimi proteolitici caratterizzati dal contenere un residuo di cisteina necessario per la catalisi ed in grado di tagliare i propri substrati nei legami posti dopo un residuo di acido aspartico.

Nel processo apoptotico la fase di esecuzione sembra essere comune a tutte o quasi le vie d'innescamento ed è costituita da una serie di reazioni enzimatiche a cascata. Una volta innescata, la reazione procede automaticamente portando a morte la cellula. Le casпси sono presenti in forma inattiva nel citoplasma; ognuna di esse è attivata dalla precedente e, secondo uno schema di cascata enzimatica, fino ad arrivare al taglio dei substrati finali. Questi includono proteine coinvolte nella riparazione e duplicazione del DNA, nello splicing dell'RNA, nel mantenimento della struttura citoscheletrica, nella divisione cellulare, nella frammentazione del DNA, ecc. (Nicholson and Thornberry, 1997). Tale successione ha permesso la distinzione tra casпси iniziatrici quali la casпси-8 e la -10 ed esecutrici quali la casпси-3, la -6 e la -7 (Salvesen e Dixit, 1997). Le casпси -3, -6 e -7 agiscono su substrati nucleari che vengono attivati durante l'apoptosi, quali le laminine e



gli enzimi preposti al riparo e alla degradazione del DNA (down-stream della cascata apoptotica).

Al contrario le caspasi -8 e -10 agiscono a monte (up-stream) della cascata apoptotica e sono preferibilmente localizzate in prossimità della membrana plasmatica. Sono state identificate altre due caspasi considerate iniziatrici, le caspasi-2 e -9, che sono attivate in seguito alla perdita di funzionalità mitocondriale.

### ***Caspasi-8***

La caspasi-8 è nota essere una delle caspasi iniziatrici del processo apoptotico. In particolare le evidenze più recenti vedono questa caspasi associata ai sistemi di traduzione del segnale apoptotico che viene dall'ambiente extracellulare via complessi recettoriali di membrana (Rytomaa et al., 1999; Cohen 1997). Essa si attiva quando i death receptors (TNFR-1 e CD95) della membrana plasmatica legano specifici ligandi, grazie al dominio di morte-DD necessario per innescare l'apoptosi. Le proteine in grado di legare il DD finora scoperte sono tre: FADD/MORT1 che lega specificamente il CD95, TRADD che lega il TNFR-1 e RIP che agisce su entrambi indistintamente. La Caspasi-8 attiva i processi che portano al disassemblamento del citoscheletro e alla frammentazione nucleare.

### ***Caspasi-9***

La caspasi-9 è riconosciuta essere la caspasi associata ai mitocondri. Tipicamente quando i mitocondri subiscono alterazioni degenerative possono liberare la caspasi-9, che in questo caso si comporta da caspasi iniziatrice del processo apoptotico.

### ***Caspasi-3***

Una delle più importanti caspasi attivate nella fase iniziale del processo è la caspasi-3, che è in grado di attivare le nucleasi che degradano il DNA dei cromosomi, provocando la condensazione e la frammentazione della cromatina come risultati finali del processo apoptotico (Tang and Kidd ,1998).



### ***Caspasi-6***

E' principalmente coinvolta nella destrutturazione del citoscheletro nucleare. Inoltre è stato recentemente osservato essere un importante attivatore della caspasi-8 citoplasmatica. La caspasi-6 sarebbe inserita nell'ambito di un ciclo enzimatico amplificativo sulla caspasi-8 iniziato dal rilascio del citocromo-c dal mitocondrio (Cowling and Downward, 2002).

### ***Bax***

E' questa una proteina tipicamente presente nel citoplasma delle cellule, la cui funzione è quella di mediare i segnali di morte, coinvolgendo in particolare l'alterazione funzionale del mitocondrio. Questa proteina assume significato quando dimerizza previa alterazione enzimatica (fosforilazione). Le vie metaboliche che la coinvolgono sono legate ai processi apoptotici , ma anche a forme di morte cellulare più propriamente vicine alle concettualità della necrosi o delle parapoptosi (Adams and Cory, 1998; Gilmore et al., 2000; Kitanaka and Kuchino, 1999). Questa definizione è stata adottata per le forme di morte cellulare che non coinvolgono fenomeni infiammatori, ma che, d'altra parte, non sono riconducibili ad un processo apoptotico propriamente detto per mancanza di un pieno coinvolgimento dei suoi fattori specifici (Sperandio et al., 2000; Hara et al, 1997).

### ***Bcl-2***

Bcl-2 può interagire con diverse proteine suggerendo un suo possibile ruolo modulatorio su una via di trasduzione del segnale che controlla la morte cellulare (Vaux et al 1988; Reed, 1994; Fernandez-Sarabia and Bischoff, 1993; Wang et al 1994). Principalmente però, Bcl-2 si lega ad altri membri della sua famiglia per formare omodimeri od eterodimeri, il cui significato funzionale è quello di definire un equilibrio tra fattori proapoptotici quali la proteina bax ed antiapoptotici (Cory, 1995) quali la proteina Bcl-2. E' stata recentemente chiarita la relazione funzionale esistente tra i fattori ad azione anti- e pro-apoptotica: se all'interno di una cellula i membri proapoptotici sono in

maggioranza, allora si formeranno in prevalenza dimeri che ne promuoveranno la morte; al contrario, se sono in maggioranza i membri antiapoptotici, si formeranno in prevalenza dimeri che ne promuoveranno la sopravvivenza. In presenza di uno stimolo apoptotico la sensibilità o la resistenza della cellula sarà dettata quindi dal rapporto relativo dei vari membri della famiglia all'interno della cellula stessa.

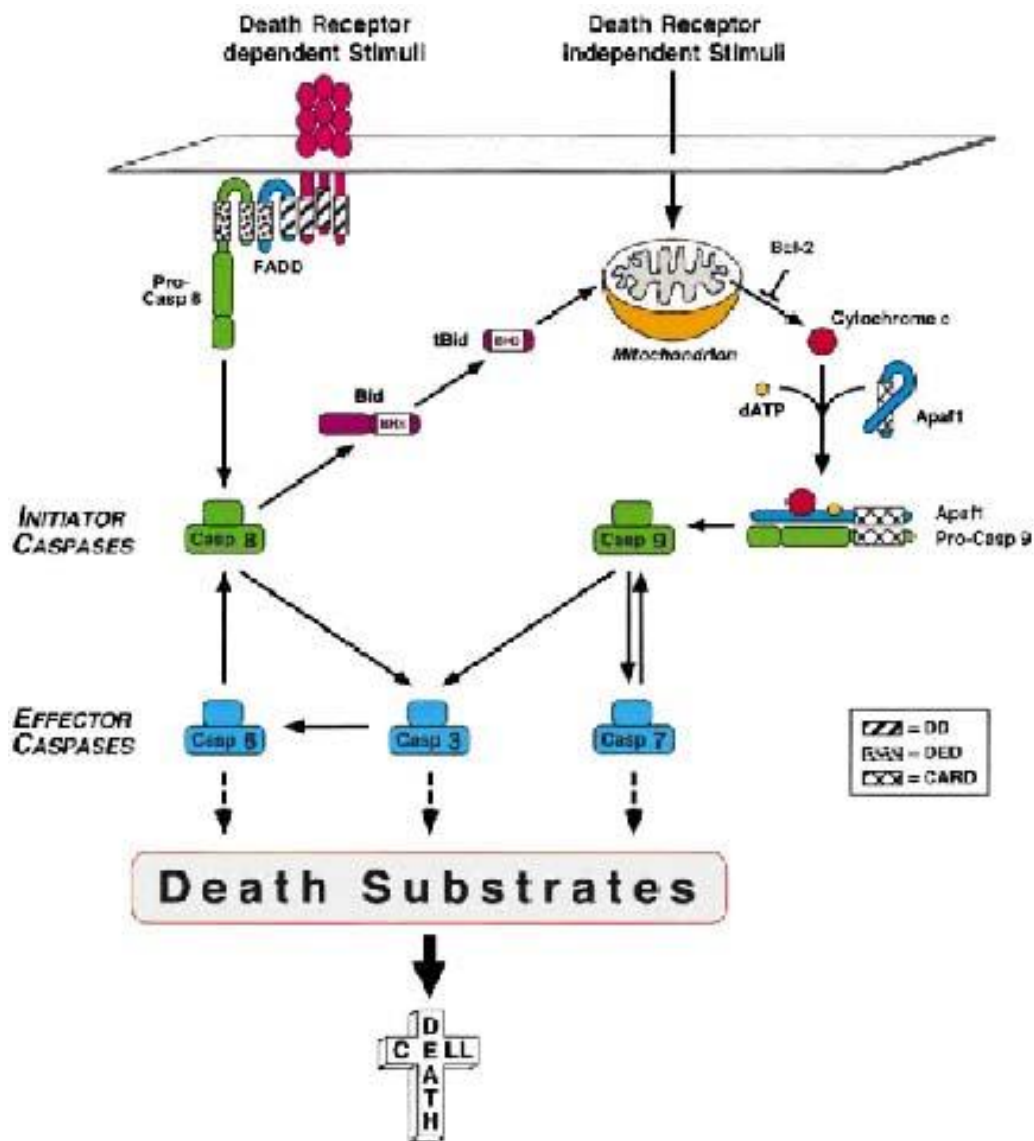


Fig 2. Schema del processo apoptotico

Le caspasi, sia quelle coinvolte nella risposta infiammatoria sia quelle caratteristiche dell'apoptosi, non devono assolutamente attivarsi per eventi casuali, per cui esistono inibitori naturali, endogeni, come la Survivina e lo XIAP ( X-linked inhibitor apoptotic protein ). Questi inibitori agiscono interagendo con i frammenti attivati delle caspasi 9, -3 e -7 determinando il blocco della reazione. Un altro inibitore delle caspasi è il c-FLIP che riduce il taglio delle caspasi 8 e -9.

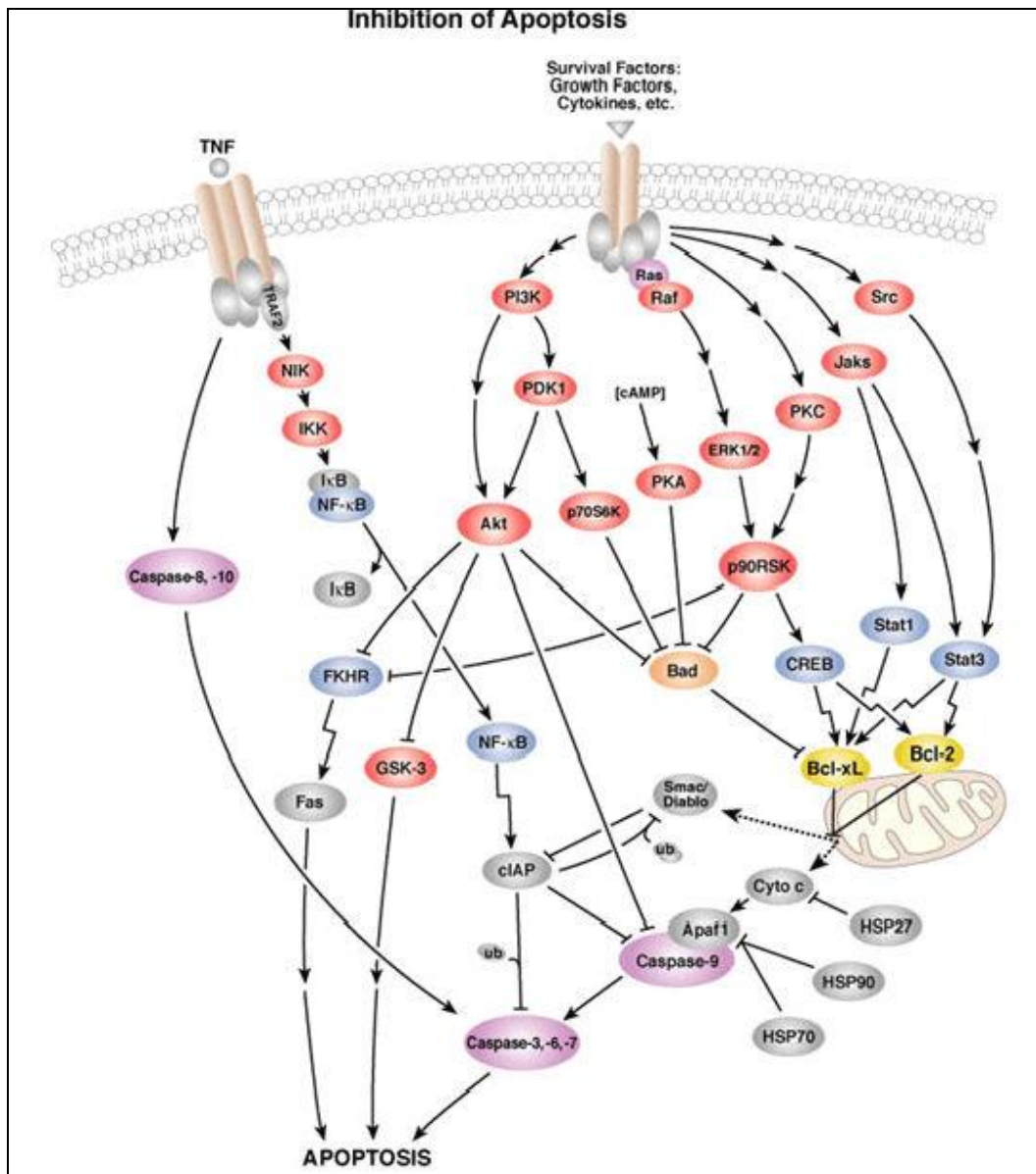


Fig 3. Schema del processo inibitorio dell'apoptosi.

## SCOPO DEL LAVORO

In questo lavoro sono stati presi in considerazione i processi apoptotici di diversi tipi di meningioma, differenti sia da un punto di vista istologico che di malignità. È stata studiata l'attivazione delle caspasi -8, -9, -6, -3, della bax, della bcl-2 e dei fattori di inibizione apoptotica al fine di determinare la loro influenza sull'apoptosi e/o sul processo proliferativo nelle diverse tipologie tumorali. Per verificare che l'attivazione delle caspasi porti alla frammentazione del DNA cellulare è stata utilizzata la tecnica TUNEL associata alla ricerca della caspasi-3 nella sua forma attivata. Questo perché la sola tecnica TUNEL attualmente non è più accettata come marker di morte cellulare per apoptosi, in quanto la sua positività è stata associata anche alle vie di morte necrotiche o para-apoptotiche (Charriaut-Marianque and Ben Ari, 1995). In questo lavoro è stato determinata anche la correlazione tra la morte cellulare per apoptosi e l'indice proliferativo (MIB-1 ed indice mitotico) (Maier et al, 1997).

## MATERIALI E METODI

Per ottenere una campionatura sperimentale omogenea sono stati adottati alcuni criteri di selezione dei campioni, consistenti in: presenza di trattamento clinico antiedemigeno con cortisone o gardenale; rifiuto di masse tumorali derivanti da recidive; assenza di infiltrazioni tissutali e di profili necrotici in meningiomi classificati di grado I (benigni). In questo studio sono stati valutati 80 meningiomi, 35 maschili e 45 femminili, ottenuti da soggetti di età  $63 \pm 12$  anni. In accordo con le diagnosi istopatologiche e con i criteri WHO, questi sono stati classificati come meningiomi di grado I: 17 Meningoteliosomi, 19 Transizionali, 15 Fibrosi, 10 Angiomatosi. Meningiomi di grado II: 9 Atipici. Meningiomi di grado III: 10 Anaplastici.

### PROCESSAMENTO DEI TESSUTI

I campioni, dopo asportazione chirurgica, sono stati immediatamente lavati con PBS e divisi in due parti; una è stata processata per il Western blot, l'altra è stata rapidamente fissata in formalina 10% per 48 ore a 4°C. Questi ultimi campioni sono stati poi deidratati ed impregnati in paraffina semi-sintetica (Sherwood Medical co. St.Louis, Mo, U.S.A.); i blocchi di paraffina sono stati successivamente tagliati in sezioni consecutive dello spessore di 5 µm con un microtomo a slitta ( Leica-Jung, Germany) e fatte aderire su vetrini portaoggetti. Le sezioni ottenute sono state suddivise per le analisi morfologiche in 5 gruppi di 8 vetrini ognuno (una sezione per vetrino). I primi vetrini di ogni gruppo sono stati processati con la tecnica *Triomica di Masson* ( DiaPath, Bergamo, Italy) per ottenere una visualizzazione istopatologica del tessuto (Sabbatini et al., 2000).

### IMMUNOISTOCHEMICA

I secondi vetrini di ogni gruppo sono stati processati con una doppia reazione immunoistochimica TUNEL (Apoptag kit, Intergene company, Purchase, NY,U.S.A.) - Caspasi 3 (rabbit policlonal antibody, clone Asp-175; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A). La tecnica TUNEL è stata utilizzata secondo protocollo ma la reazione DAB è stata intensificata con l'utilizzo di nickel diaminobenzidina (Vectastaine Elite kit, Vector),che determina un deposito nero nucleare; successivamente questi vetrini sono stati trattati per la reazione immunoistochimica verso la caspasi 3 attivata, come di seguito descritto.

Gli altri vetrini di ciascun gruppo sono stati processati con reazioni immunoistochimiche per la caspasi-8 attivata ( mouse monoclonal antibody, clone Asp-384; Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.), la caspasi-9 attivata ( rabbit polyclonal, clone Ab-2; Oncogene, San

Diego, CA, USA), la caspasi-6 attivata (rabbit polyclonal, clone H194; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.), la bax (rabbit polyclonal, clone P19; Santa Cruz Biotechnology), la bcl2 (rabbit polyclonal, clone  $\Delta C21$ ; Santa Cruz Biotechnology) e il Ki-67 (mouse monoclonal, Ab-1, Oncogene).

Ogni sezione è stata idratata ed incubata in siero aspecifico per un'ora a temperatura ambiente e successivamente trattata con anticorpo primario in camera umida, a 4°C per una notte. Il prodotto di immunoreazione è stato rilevato incubando le sezioni con un anticorpo secondario anti-rabbit o anti-mouse complessato con il sistema avidina-biotina ed evidenziato tramite reazione DAB (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame CA, USA). Ematossilina è stata utilizzata per contrastare i nuclei cellulari.

Sezioni di controllo sono state trattate come descritto in precedenza ma utilizzando IgG non immune di topo, oppure omettendo l'anticorpo primario; in queste condizioni non sono state osservate reazioni immunoistochimiche positive.

### ANALISI MORFOMETRICHE

Le analisi morfometriche sono state eseguite analizzando le cellule positive alle reazioni immunoistochimiche e/o alla reazione TUNEL utilizzando un analizzatore d'immagine (Qwin, Leica). La percentuale di cellule positive è stata determinata come rapporto tra cellule positive rispetto al numero totale delle cellule osservabili. Sono stati analizzati dieci campi microscopici di 100/200 nuclei (ingrandimento 40X).

L'indice mitotico (MI) è stato determinato totalizzando il numero delle figure mitotiche trovate in dieci campi ad alto ingrandimento (400X) analizzando i vetrini con la colorazione della tricromica di Masson.

Su tutti i vetrini è stata inoltre valutata la presenza e la positività di leucociti presenti nei campioni.

## WESTERN BLOTTING

In seguito ad omogenizzazione e centrifugazione dei campioni, un'uguale quantità di proteine di ciascun meningioma è stata caricata per la corsa elettroforetica su un gel al 12% di SDS in poliacrilamide. Il gel è stato poi trasferito su membrana in nitrocellulosa per un'ora. Le membrane sono state poi trattate con buffer Tris-Tween (pH 7.6) al 3% di siero bovino per un'ora e successivamente incubate con gli anticorpi I: caspasi-8 (rabbit polyclonal, clone H134; Santa Cruz Biotechnology), caspasi-9 (rabbit polyclonal, clone H170; Santa Cruz Biotechnology), caspasi-3 (rabbit polyclonal, clone H277; Santa Cruz Biotechnology), caspasi-6 (rabbit polyclonal, clone Ab-2, Oncogene), bax (rabbit polyclonal, clone P19; Santa Cruz Biotechnology), bcl-2 (rabbit polyclonal, clone C21; Santa Cruz Biotechnology), c-FLIP (rabbit polyclonal; cat. 06-864; Up-State NY, USA), XIAP (mouse monoclonal, clone 2F1, Stressgen, Ann Arbor, Michigan U.S.A.), Survivina (goat polyclonal, clone N18; Santa Cruz Biotechnology). Tali anticorpi sono stati rilevati con substrati chemiluminescenti (ECL, Amersham International, Little Chalfont, U.K.) coniugati con perossidasi di rafano anti rabbit o anti mouse o anti goat (Sigma, St. Luis, MI, U.S.A.).

Sono state poi eseguite analisi densitometriche semiquantitative delle bande ottenute con western blot per valutare l'espressione dei fattori apoptotici nei vari campioni.

## ANALISI DEI DATI

La media dei diversi parametri è stata calcolata come  $\text{media} \pm \text{Errore Standard della Media}$ ; si sono fatte analisi statistiche della varianza (ANOVA) con livello di significatività posto pari a  $p < 0.05$ .



## RISULTATI

Le analisi istopatologiche ottenute dalla tricromica di Masson hanno rilevato la presenza di nuclei picnotici in tutti i meningiomi analizzati ad eccezione del meningoteliomatoso; nell'atipico e nell'anaplastico sono invece stati osservati profili di cellule necrotiche, non associate a positività immunohistochimica.

In tutte le tipologie di meningiomi analizzate non si è riscontrata la presenza di alcun frammento attivo della caspasi-6. La doppia reazione TUNEL+caspasi-3 ha rilevato la colocalizzazione di due segnali apoptotici in tutti i meningiomi da noi considerati ad eccezione del meningoteliomatoso; quasi tutti i nuclei positivi alla TUNEL hanno mostrato colocalizzazione con i segnali positivi all'immunohistochimica per la caspasi-3. Meno del 10% delle cellule positive alla TUNEL non ha mostrato colocalizzazione (Fig 4 e Fig 5A).

Nei meningiomi meningoteliomatosi non sono state riscontrate positività per la reazione TUNEL ma numerose cellule positive per la forma attiva della caspasi-3 (Fig 5B), con valori statisticamente simili ai risultati ottenuti per questa caspasi negli altri meningiomi di grado I. In alcuni dei campioni analizzati, l'immunoreattività della caspasi-3 è stata occasionalmente associata a profili nucleari picnotici ma nel meningioma meningoteliomatoso l'immunoreattività della caspasi-3 si è trovata associata a profili nucleari tondeggianti con nucleo eterocromatico, osservazione non ben compatibile con un profilo di cellula apoptotica. Nei meningiomi meningoteliomatosi le cellule positive alla Bcl-2 erano presenti ma numericamente inferiori rispetto a quanto riscontrato negli altri meningiomi analizzati.

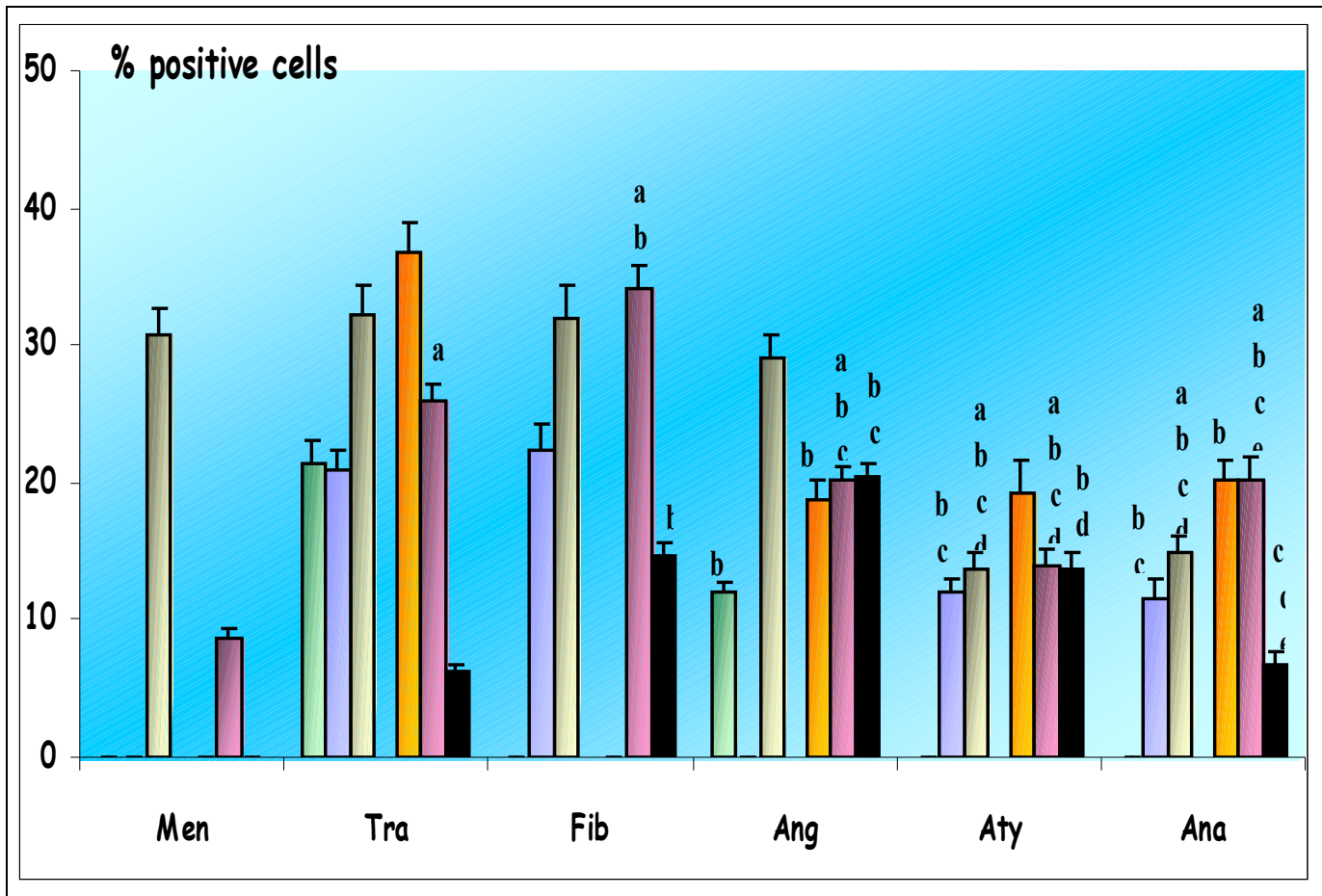
I transizionali (grado I) e gli anaplastici (grado III) hanno mostrato un minor numero di cellule positive alla TUNEL rispetto agli altri tipi di meningiomi; entrambe le tipologie tumorali hanno invece presentato un elevato valore di positività alla reazione Bax, mentre inferiore è risultata la risposta alla Bcl-2 ( $p < 0,05$ ) rispetto alla Bax. Le cellule positive alla

Bcl-2 sono spesso state osservate raggruppate, diversamente dalle cellule positive gli altri segnali apoptotici studiati.

I meningiomi fibromatosi (grado I) e gli atipici (grado II) hanno rivelato un numero simile di cellule positive alla TUNEL ( $p < 0,05$ ); è stato osservato invece un numero maggiore di cellule immunoreattive per i diversi fattori apoptotici ( $p < 0,05$ ) nei meningiomi fibromatosi rispetto agli atipici. Nei fibromatosi inoltre non è stata riscontrata la presenza di positività per cellule immunoreattive alla Bax, mentre molto più numerose ( $p < 0,05$ ) si sono rivelate quelle positive alla Bcl-2 rispetto agli altri campioni studiati.

Nei meningiomi angiomatosi si è presentato il più alto livello di positività alla TUNEL ( $p < 0,05$ ), non è però stata riscontrata la presenza della caspasi-9 in forma attiva, le cellule immunopositive alla Bcl-2 si sono presentate in numero simile ( $p < 0,05$ ) a quelle positive alla Bax. Inoltre questa tipologia tumorale, assieme ai transizionali, ha rivelato la presenza di cellule positive alla caspasi-8 nella sua forma attiva ( $p < 0,05$ ).

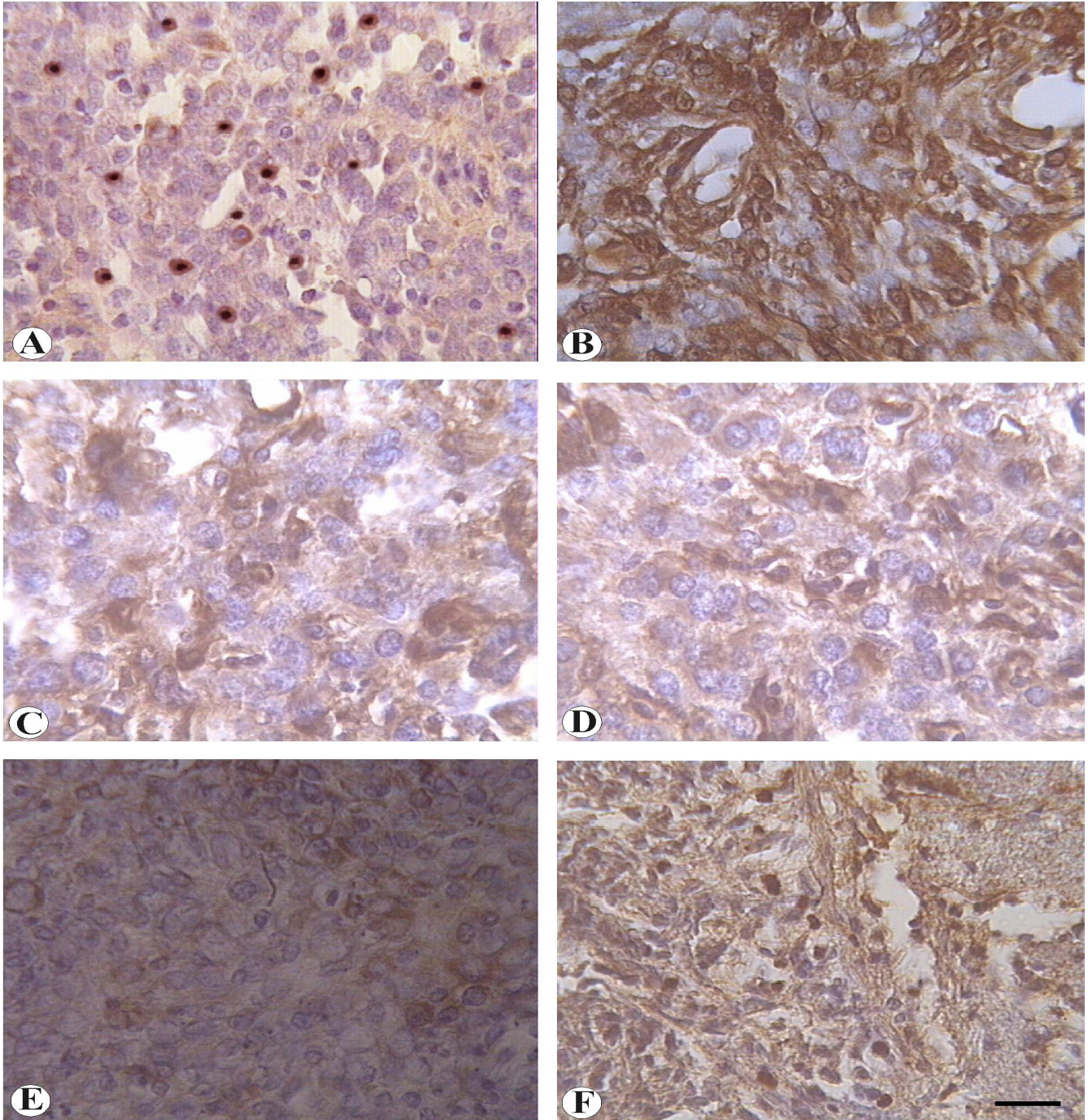
In Fig4 e in Fig5 è riassunta la distribuzione delle cellule positive in seguito alle diverse reazioni immunoistochimiche.



**Fig 4.** Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule positive alle reazioni immunohistochimiche nelle diverse tipologie tumorali. Men=meningoteliomatoso; Tra=transizionale; Fib=fibroso; Ang=angiomaso; Aty=atipico; Ana=anaplastico.  
 Rosa: Bcl-2  
 Nero: TUNEL + Caspasi-3  
 Arancione: Bax  
 Giallo-marrone: Caspasi-3  
 Verde: Caspasi-8  
 Viola: Caspasi-9

Significatività per  $p < 0,05$  . a = vs. Meningoteliomatoso  
 b = vs. Transizionale  
 c = vs. Fibroso  
 d = vs. Angiomaso  
 e = vs. Atipico





**Fig 5.** Immagini di reattività per i diversi fattori apoptotici studiati. A: doppia immunoistochimica TUNEL+caspasi-3 in mening. Anaplastico; B: caspasi-3 in mening. Meningoteliomatoso; C: Bax in mening. Angiomatoso; D: caspasi-8 in mening. Angiomatoso; E: caspasi-9 in mening. Transizionale; F: infiltrazione tissutale di leucociti, reazione Bax in mening. Anaplastico.

La conta del numero di cellule positive alla reazione immunohistochimica verso Ki-67 e la conta del numero di mitosi ha rivelato la tendenza alla proliferazione delle masse tumorali in accordo con l'identificazione del grado senza significative differenze con i meningiomi di grado I (tabella 1).

<b>Meningioma grading</b>	<b>HISTOPATHOLOGIC CRITERIA OF TUMOR MASS GROWTH</b>		
	<b>MIB 1</b> (Ki-67 nuclear antigen immunohistochemistry)	<b>Mithotic index</b> (N° /2.5 mm <sup>2</sup> )	<b>Leukocytes</b> (N° /2.5 mm <sup>2</sup> )
<b>GRADE I</b>	2 ± 1 %	2 ± 1	3 ± 1
<b>GRADE II</b>	11 ± 1 % *	9 ± 1 *	7 ± 2 *
<b>GRADE III</b>	50 ± 9 % **	32 ± 9 **	12 ± 3 **

**Tab. 1** . La tabella riassume i criteri istopatologici della crescita della massa tumorale, analizzati in accordo ai criteri morfologici ed all'infiltrazione leucocitaria.

I dati sono riportati come media ± S.E.M. dei dati ottenuti dall'analisi di cinque differenti vetrini per ogni campione; \* = p<0,05 vs.grado I; \*\* = p<0,05 vs.grado I e II.

Le analisi densitometriche dei profili di attivazione delle caspasi, della Bax e della Bcl-2, ottenute da Western blot hanno confermato i dati ottenuti dall'immunoistochimica.

E' stata osservata un'espressione eterogenea delle diverse caspasi nelle differenti tipologie tumorali studiate. In particolare le analisi con Western blot hanno evidenziato una non attivazione della caspasi-6. Allo stesso modo l'assenza di attivazione della caspasi-8 nei meningiomi fibromatoso ed atipico è stata attribuita all'assenza dei precursori di questa caspasi.

Un significativo rapporto costante è stata osservata tra le bande corrispondenti alle proforme delle caspasi e quelle corrispondenti alle forme attive nella caspasi-3 e nella caspasi-9. Le stesse bande nel meningioma atipico e nell'anaplastico sono state osservate essere significativamente meno intense rispetto a quelle riscontrate nei meningiomi di grado I.

Le analisi con Western blot degli inibitori dell'apoptosi hanno mostrato solo nel meningioma transizionale la presenza del c-Flip, mentre lo XIAP è stato osservato nel meningoteliosomatoso, nel transizionale e nell'anaplastico. Le analisi densitometriche hanno evidenziato nel meningioma transizionale livelli più elevati di espressione dello XIAP ( $p < 0,05$ ), mentre nell'anaplastico e nel meningoteliosomatoso questi livelli si sono presentati inferiori ( $p < 0,05$ ).

In tutte le tipologie tumorali considerate si è riscontrata l'espressione della Survivina; nei meningiomi di grado I tale espressione è molto bassa, mentre è significativamente più rilevante negli atipici e negli anaplastici.

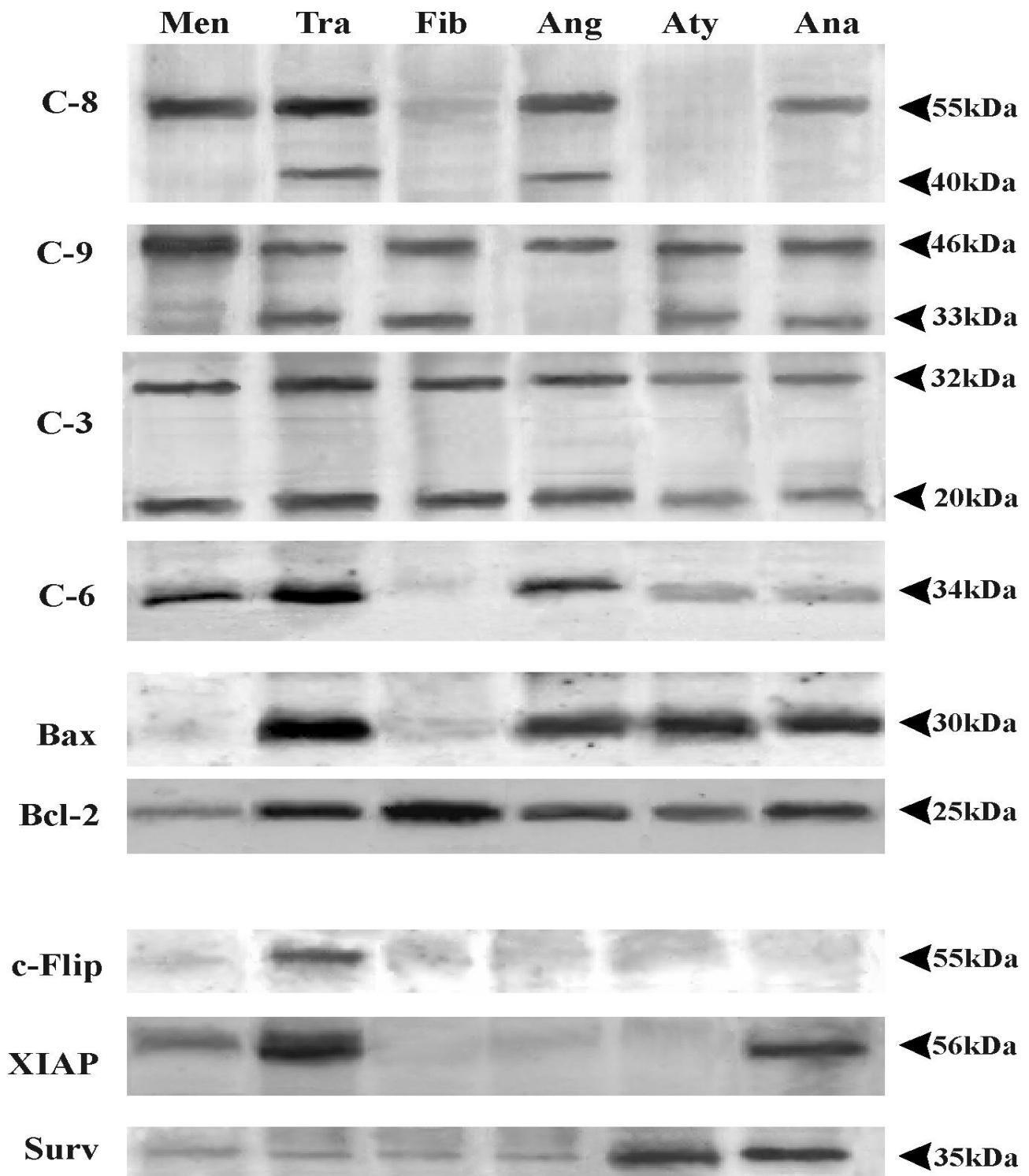
L'analisi istologica dell'infiltrazione leucocitaria ha mostrato una presenza cellulare proporzionale ai diversi gradi tumorali, con totale assenza nel meningoteliosomatoso (Tab.1 e Fig.2F).

Le analisi immunoistochimiche hanno rivelato la presenza di leucociti positivi per il frammento attivo della caspasi-9, della Bax e della doppia reazione TUNEL+caspasi-3. La

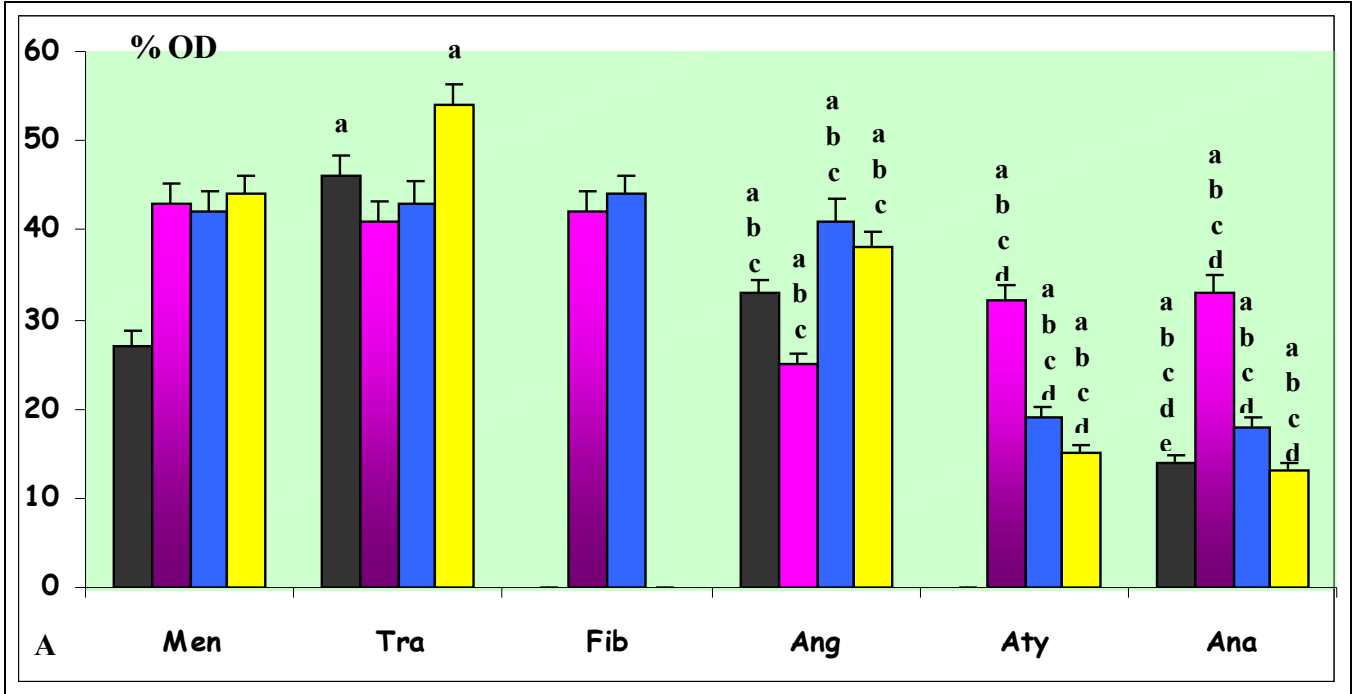
presenza e la posizione dei leucociti sia positivi che non, non è apparsa associata alle cellule tumorali immunopositive per i segnali apoptotici analizzati (Fig.2F).

I risultati dei Western blot e delle analisi densitometriche dei fattori apoptotici considerati sono riassunti in Fig. 6 ed in Fig.7.

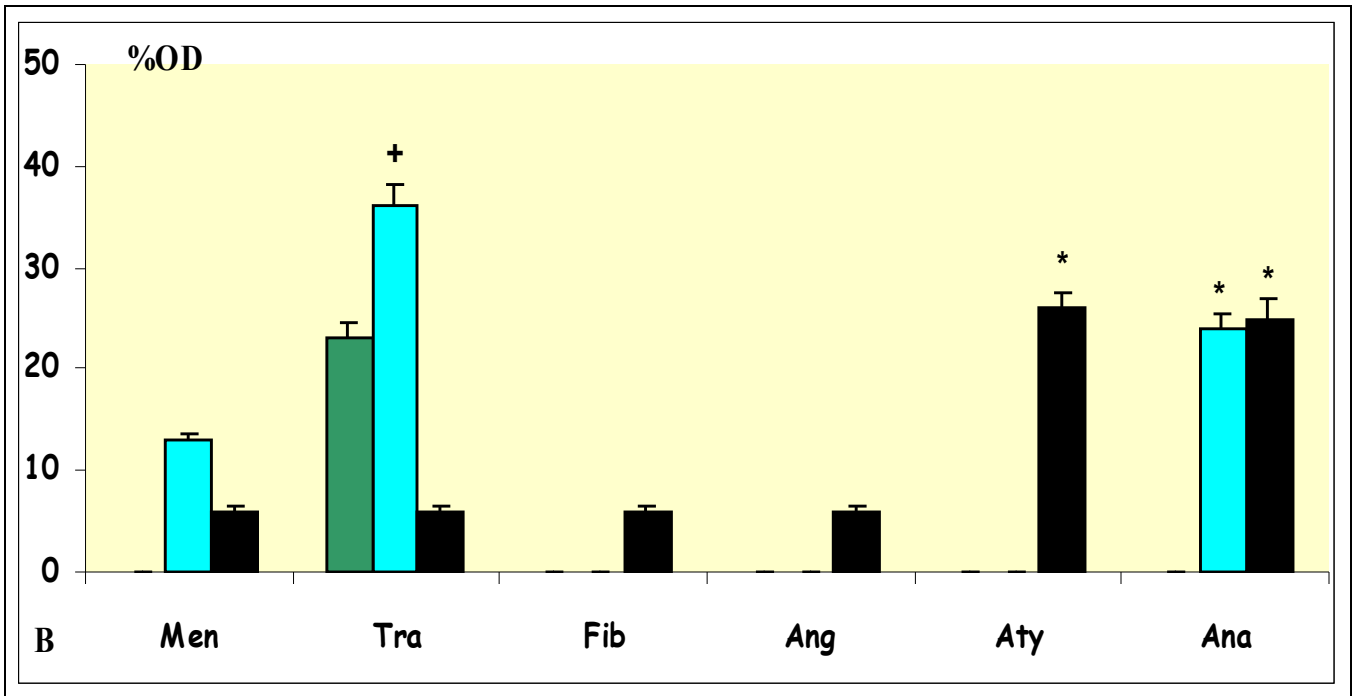




**Fig.6.** Analisi Western blot dell'espressione e dell'attivazione dei fattori apoptotici studiati. C=caspasi. Men=meningoteliosomatoso; Tra=transizionale; Fib=fibroso;



Ang=angiomaso; Aty=atipico; Ana=anaplastico.



**Fig.7.** Istogramma a barre delle analisi densitometriche delle bande ottenute con Western blot. A: istogramma a barre delle caspasi; nero: procaspasi-8, rosa: procaspasi-9, blu: procaspasi-3, giallo: procaspasi-6. B: istogramma a barre degli inibitori dell'apoptosi; azzurro: XIAP, nero: Survivina, verde: c-FLIP. Significatività per  $p < 0,05$ . a = vs. Meningoteliomatoso, b = vs. Transizionale, c = vs. Fibroso, d = vs. Angiomatoso, e = vs. Atipico.

## DISCUSSIONE

I meningiomi sono delle neoplasie caratterizzate da una lenta crescita della massa tumorale; i tumori atipici possono diventare invasivi e caratterizzati da una crescita più rapida, mentre gli anaplastici possono dare metastasi. L'analisi dei profili apoptotici può essere un valido sistema per studiare il rapporto tra morte e proliferazione cellulare nelle neoplasie, dato importante per una migliore identificazione della risposta clinica nelle diverse tipologie tumorali.

E' risaputo che in molti tumori la trasformazione cellulare è accoppiata ad un silenziamento genetico o ad un'alterazione del processamento di diversi fattori come le caspasi, importanti per determinare i processi di morte cellulare.

Spesso le cellule tumorali acquisiscono un miglior profilo di sopravvivenza producendo più fattori inibitori come la survivina, gli inibitori delle caspasi-3, -7 e -9, i cui alti livelli sono spesso associati alla resistenza terapeutica e alla risposta clinica nella prognosi tumorale. (Sasaki et al., 2002; Kayaselcuk et al., 2004).

### MENINGIOMI DI GRADO I

Il basso indice di proliferazione (MIB-1 ed indice mitotico) associato alla sostanziale assenza dell'espressione della survivina conferma le caratteristiche benigne di questi tipi di meningiomi. Nei meningiomi di grado I da noi studiati, le vie estrinseche dell'apoptosi sembrano essere sostanzialmente alterate; è stata largamente osservata l'alterazione dell'espressione e/o del processamento della caspasi-8, oppure il blocco

dell'attivazione di questa caspasi da parte di fattori inibitori quale il c-Flip, come nei meningiomi transizionali.

Le vie intrinseche dell'apoptosi, generalmente associate all'attivazione della caspasi-9 e della Bax, sembrano essere differentemente attivate, ad eccezione che nel meningoteliosarcoma. Per spiegare le differenti attivazioni della caspasi-9 e della Bax nei meningiomi fibromatosi e negli angiomas (Fig.6) possiamo far riferimento alle caratteristiche propriamente apoptotiche della caspasi-9, a differenza di quelle della Bax, coinvolta in vie di morte sia apoptotiche che non apoptotiche. Da questi dati possiamo ipotizzare la presenza di due alternative vie di morte cellulare, quella propriamente apoptotica e quella non apoptotica che hanno il loro punto di controllo nell'integrità mitocondriale. Di conseguenza nei meningiomi transizionali la sovraespressione della Bax può essere la conseguenza dell'innattivazione da parte dello XIAP del frammento attivo della caspasi-9.

La ben presente attivazione della caspasi-3 e l'assenza di profili necrotici tissutali sembra indicare la prevalenza di morte cellulare per via apoptotica o simil-apoptotica. In assenza di inibitori apoptotici, la differente espressione della Bcl-2, in virtù della sua azione antiapoptotica, può rappresentare la base per spiegare il differente numero di cellule morte osservato.

Nei meningiomi meningoteliosarcomatosi l'unico segnale ben osservabile è quello relativo all'attivazione della caspasi-3; tale attivazione non associata a nuclei positivi alla TUNEL o ad altri segnali apoptotici, orienterebbe verso fenomeni non apoptotici. E' noto infatti che l'attivazione della caspasi-3 può essere coinvolta in processi proliferativi o di sopravvivenza piuttosto che di morte cellulare.

### *MENINGIOMI DI GRADO II E III*

I meningiomi di grado II (atipici) e quelli di grado III (anaplastici) sono caratterizzati dall'aver una maggiore aggressività, più alti segnali proliferativi (MIB1 e indice mitotico) e una maggiore espressione della survivina e della Bcl-2 rispetto ai meningiomi di grado I. In queste tipologie tumorali le vie estrinseche apoptotiche sono alterate come si può osservare dalla mancata espressione e/o dall'attivazione della caspasi-8, mentre le vie intrinseche sembrano conservate come si può osservare dalla crescita di espressione e dall'attivazione della caspasi-9. Tuttavia nei meningiomi anaplastici la forte presenza di inibitori apoptotici quali la Survivina e lo XIAP potrebbero indicare un'inefficacia delle vie apoptotiche intrinseche, sebbene siano state riscontrate cellule positive alla TUNEL colocalizzate con l'attivazione della caspasi-3. La forte presenza di inibitori dell'apoptosi risulta pertanto compatibile con l'attivazione delle caspasi ma non con la loro attività.

La nostra ipotesi è che nei meningiomi di grado III la morte cellulare possa essere determinata da vie simili all'apoptosi, che hanno forse nell'elevata espressione di Bax e Bcl-2 alcuni dei segnali coinvolti. D'altra parte è stato evidenziato che la morte apoptotica avviene anche in presenza di un ampio spettro di inibitori delle caspasi. Nei meningiomi di grado II invece l'elevato numero di cellule morenti valutato, associato all'espressione della Survivina e alla bassa espressione della Bcl-2, potrebbe suggerire la contemporanea presenza di vie di morte propriamente apoptotiche e simil-apoptotiche.

La presenza di leucociti non sembra influenzare l'espressione dei segnali immunoistochimici nei leucociti, piuttosto sembrano essere correlati alle alterazioni tissutali presenti nei tumori. Infatti la maggior infiltrazione leucocitaria è stata osservata nei meningiomi anaplastici che presentano la maggior alterazione del profilo cellulare. L'espressione dei segnali apoptotici è compatibile con le caratteristiche fisiologiche di queste cellule morte per stress ossidativo durante la loro attività.

## CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata osservata un'espressione eterogenea dei diversi segnali di morte apoptotica che differisce in modo abbastanza proporzionale a seconda della differente aggressività clinica del meningioma considerato. Complessivamente le cellule tumorali hanno mostrato la tendenza a disattivare le vie apoptotiche attivando l'espressione o la soppressione di queste attraverso gli inibitori delle caspasi attivate. A supporto di questa affermazione abbiamo osservato, nonostante la presenza della sua proforma, la non attivazione della caspasi-6, che rappresenta uno delle caspasi più importanti per l'amplificazione ed il susseguirsi della cascata apoptotica. La non attivazione della caspasi-6 potrebbe avere la sua causa in un'alterazione delle caspasi a monte dell'intero processo apoptotico.

Nel nostro lavoro è emerso un dato importante relativo ai meningiomi meningoteliosarcomi; nei tumori di grado I una trasformazione clinica simile non corrisponde a un profilo biochimico simile, anzi la differente morfologia dell'istologia tumorale sembra corrispondere ad un peculiare profilo nella risposta fisiologica cellulare, sicuramente verificato di morte/sopravvivenza cellulare.

Questi dati invitano ad una maggiore attenzione quando differenti tipi di meningioma di grado I sono collegati sulla base della loro classificazione clinica. Una miglior comprensione dei processi apoptotici attivati in diversi tipi di meningiomi può portare ad

una maggior conoscenza dei processi biochimici riguardanti il rapporto di crescita e di morte cellulare, permettendo così un adeguato intervento clinico e farmacologico.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326; 1998.
- Charriaut-Marianque C and Ben Ari Y. A cautionary note on the use of TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7: 61-64; 1995.
- Cowling V and Downward J. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell death Diff.* 9: 1046-1056; 2002.
- Borner C and Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Diff* 6: 497\_507; 1999.
- Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandanaabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58: 356 - 370; 2001
- Elkon KB. Caspases: multifunctional proteases. *J Exp Med* 12: 1725-1727; 1999.
- Griffiths SD, Clarke AR, Healy LE. Absence of p53 permits propagations of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene* 14: 523-531; 1997.
- Guo M, and Hay BA. *Cell proliferation and apoptosis. Curr Opin Biol* 11: 745-752; 1999.
- Ho DMT, Hsu CY, Ting LT, Chiang H. Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas. *Cancer* 94: 1538-1547; 2002.
- Hopkins-Donaldson S, Bodmer J, Balmas Bourloud K, Beretta Brognara C, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 60: 4315-4319; 2000.
- Kayaselcuk F, Zorludemir S, Bal N, Erdogan B, Erdogan S, Ermen T. The expression of survivin and Ki-67 in meningiomas: correlation with grade and clinical outcome. *J Neurooncol* 67: 209 - 214; 2004.
- Kim R, Emi R, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* 208: 319 - 326; 2006.



- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, Peter ME (Cytotoxicity-dependent APO-1(Fas/CD95)-associated protein form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 15: 5579-5788. 1995).
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. International histological classification of tumors. Histological typing of tumors of the central nervous system, 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 1993.
- Konstantinidou A.E., et al. Expression of apoptotic and proliferation markers in meningiomas. *J Pathol* 186: 325-330; 1998.
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z., Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 55752-5757. 1999.
- Kroemer G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Diff* 4: 443 - 456; 1997.
- Kuwana T, Smith JJ, Muzio M, Dixit V, Newmwyer DD and Kombluth S. Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 273: 16589-16594; 1998.
- Lowe SW, Jacks T, Housman DE, Ruley HE. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2026-2030; 1994.
- Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rossler K, Ofner D, Budka H. Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:496-506; 1997.
- Matsumori Y, Northington FJ, Hong SM, Kayama T, Sheldon RA, Vexler ZS, Ferriero DM, Weinstein PR, Liu J. Reduction of caspase-8 and -9 cleavage is associated with increased c-FLIP and increased binding of Apaf-1 and Hsp70 after neonatal hypoxic/ischemic injury in mice overexpressing Hsp70. *Stroke* 37:507-512; 2006.
- Moreno RD, Lizama C, Urzua N, Vergara SP, Reyes JG. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat.
- Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac /DIABLO. *J Biochem* 137: 125-132; 2005.
- Nicholson DW and Thornberry NA. Caspase: Killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22: 299-306; 1997.
- Patel T., Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 10:587-597; 1996.
- Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma Grading. An analysis of histologic parameters. *The Am J Surg Pathol* 21: 1455 - 1465; 1997.

- Renò F., Sabbatini M., Lombardi F., Stella M., Pezzato C., Magliacani G., Cannas M. In vitro mechanical compression induces apoptosis and regulates cytokines release in hypertrophic scars. *Wound Rep and Reg.* 11: 331 - 336; 2003.
- Sabbatini M., Vitaioli L., Baldoni E., Amenta F.: Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 294: 948-54 2000.
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M., 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 9, 443-446.
- Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA. Expression of surviving, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 104: 105-109; 2002
- Schwerk C., Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1453-1458; 2003.
- Scott FL, Denault JB, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 24: 645-655; 2005.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome-c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487; 1999.
- Smith DW and Day TA. Neurochemical identification of fos-positive neurons using two-colour immunoperoxidase staining. *J Neurosci Methods* 47: 73-83; 1993.
- St. Clair EG, Anderson SJ, Oltvai ZN. Bcl-2 counters apoptosis by Bax heterodimerization-dependent and -independent mechanisms in the T-cell lineage. *J Biol Chem* 272: 29347-29355.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signalling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245; 2000.
- Tang D, Kidd VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for function during apoptosis. *J Biol Chem* 273:28549-28552; 1998.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84: 627-639; 2005.
- Zangemeister-Wittke U andf Zieger A. Bcl-2 antisense therapy for cancer: the art of persuading tumor cells to commit suicide. *Apop* 3: 67-74; 1998.
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature* 369: 321-323; 1994.

## SEMINARI SEGUITI

18 Ottobre 2005 - "Genetica della sordità" - Prof. Paolo Gasparini

18 Novembre 2005 - "Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits" - Dr. Diego Cotella

22 Novembre 2005 - "HCV-related steatosis: pathogenic mechanisms and clinical implications" - Prof. Luigi Elio Adinolfi

25 Novembre 2005 - "Mechanisms of transcriptional regulation of disease" - Prof. Robert Tjian

19 Gennaio 2006 - "Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation" - Prof. ssa Maria Grano

13 Febbraio 2006 - "New perspectives in metabotropic glutamate receptors neurobiology" - Prof. Ferdinando Nicoletti.

15 Febbraio 2006 - "Anticorpi Ricombinanti: un potente Tool Biotecnologico" - Prof. Daniele Sblattero

20 febbraio 2006 - "Tecniche di biologia e genetica molecolare nella diagnostica del carcinoma del colon". - Dott.ssa Daniela Furlan

13 Marzo 2006 - "Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia" - Dr. Antonia Follenzi

20 Marzo 2006 - "The natural course of preclinical type I diabetes" - Prof. Mikael Knip

30 Marzo 2006 - "Analisi spettrale dell'intervallo RR dell'elettrocardiogramma. Un moderno strumento per l'analisi digitale dell'attività elettrica cardiaca" - Dott. Andrea Brunori

6 aprile 2006 - "Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia"" -Dott .F.Forconi

4 Maggio 2006 -"Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale" - Dott. Luciano Mutti

4 Maggio 2006

"Le basi neurologiche del sonno" - Prof.Cantello

"Deprivazione del sonno come terapia" - Prof.ssa Zeppegno

"Il Sogno" - Prof. Torre,

" Comunicazione con il paziente in coma" - Prof. Della Corte

30 Maggio 2006 - "Sperm mediated gene transfer. Storia e applicazioni" - Dr. Marialuisa Lavitrano

15 Giugno 2006 - "Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload" - Prof. Guido Tarone

22 giugno 2006 - "Epatite ricorrente da HCV dopo trapianto di fegato" - Prof. P.Toniutto.

27 Giugno 2006 - "Osteointegrazione e superfici implantari" - Prof.ssa Lia Rimondini

27 Giugno 2006 - "Osteointegrazione e superfici implantari" - Prof.ssa Lia Rimondini

13 Luglio 2006 - "L'approccio riabilitativo delle malattie cardiovascolari" - Dr.P. Giannuzzi

11 Settembre 2006 - "The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis" - Dr Prof. Dieter Brömme

- Il lavoro presentato ha dato luogo alla seguente pubblicazione:

**"Immunoistochemical signals of apoptotic pathways in several types of meningioma"**

M. Sabbatini, C. Comi, A. Chiocchetti, V. Piffanelli, P. Car, Passoni, U. Dianzani, F. Monaco and M. Cannas

- Partecipazione in data 24 novembre 2005 al "XV Congresso Nazionale del Gruppo Italiano per lo Studio della Neuromorfologia (GISN)". Accademia delle Scienze in Bologna, via Zamboni 31, Bologna