

Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XX

Candidato: Valentina Piffanelli

Tutor: Prof. Mario Cannas

Il periodo di dottorato si è articolato in due principali tematiche sperimentali, una relativa allo studio del fenomeno apoptotico in meningiomi di diverso tipo e grado, l'altra riguardante profili di adesione e proliferazione di cellule di neuroblastoma SK-N-BE a contatto con biomateriali vetrosi dopati con zinco.

I due lavori sono presentati con i seguenti titoli:

- INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA DELLE VIE APOPTOTICHE IN DIVERSI TIPI DI MENINGIOMA

- STUDIO DI CELLULE DI NEUROBLASTOMA SK-N-BE SU BIOVETRI DOPATI CON ZINCO.

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.

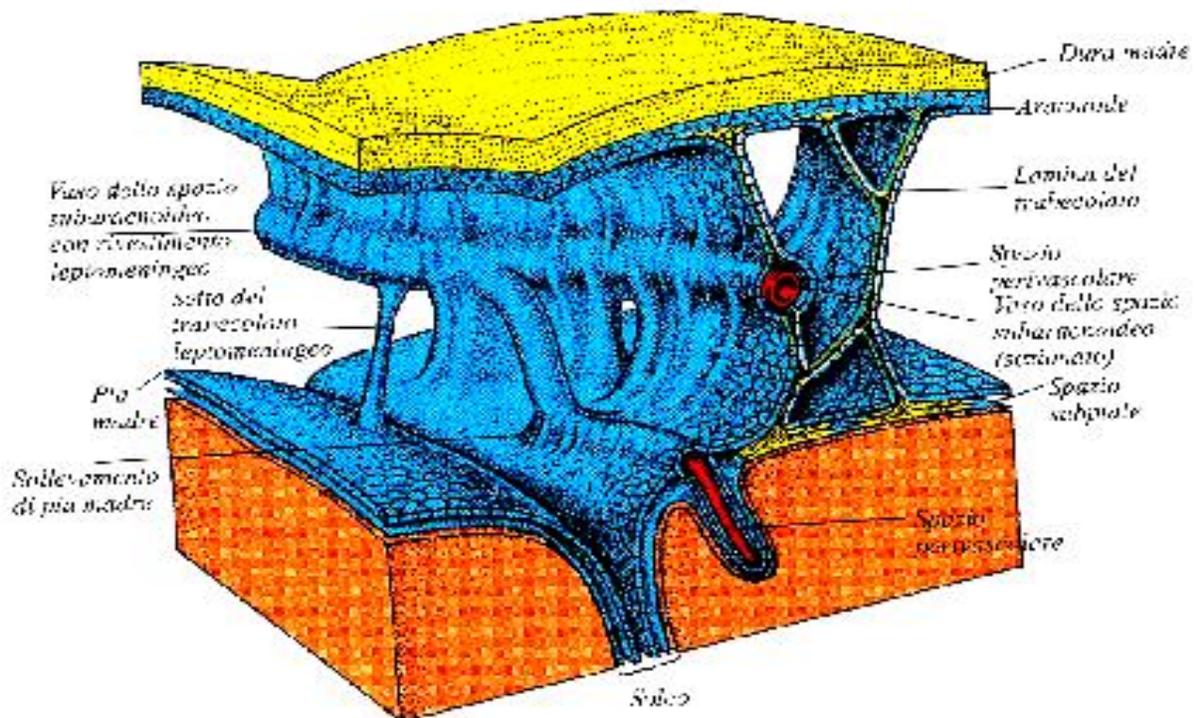


Fig 1. Struttura delle meningi

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 vorticosi. 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 oblitterato.

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.

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 β Convertine Enzime).

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

Le caspasi 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 caspasi 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 caspasi iniziatrici quali la caspasi-8 e la -10 ed esecutrici quali la caspasi-3, la -6 e la -7 (Salvesen e Dixit, 1997). Le caspasi -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.

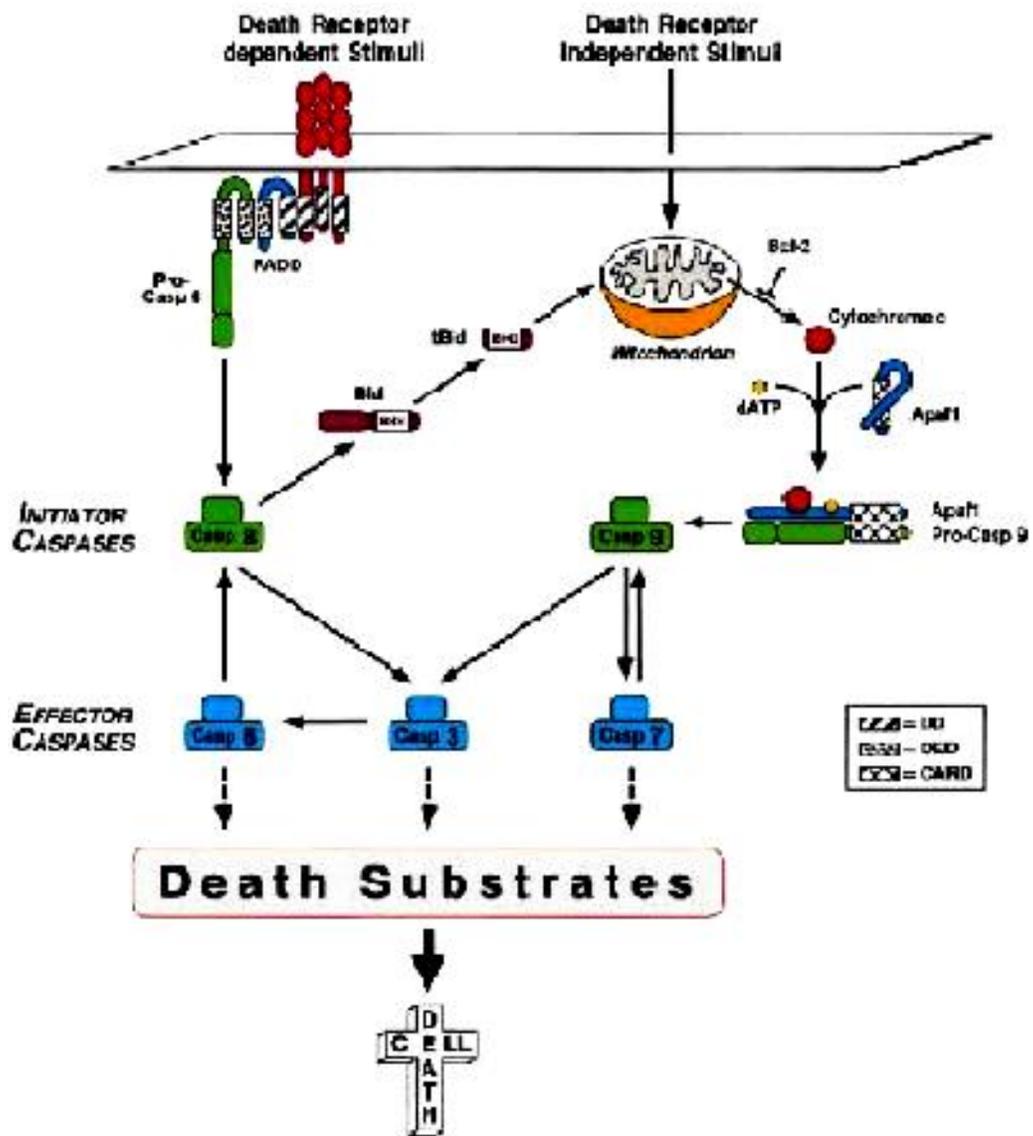


Fig 2. Schema del processo apoptotico

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.

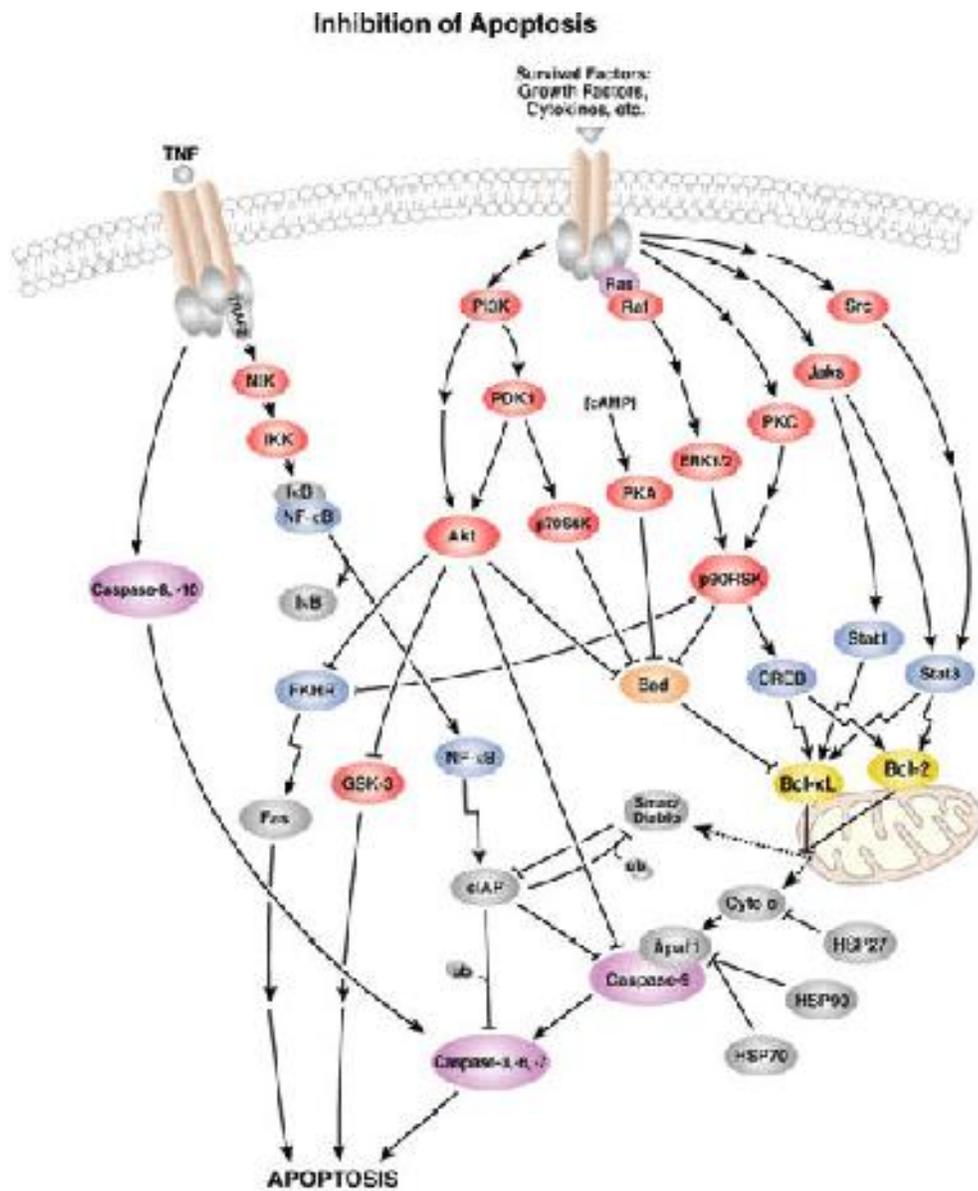


Fig 3. Schema del processo inibitorio dell'apoptosi.

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 ± 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 Δ 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 (Vectastaine Elite kit, Vector Laboratories, Burlingam 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 media \pm 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 meningoteliosarcoma; 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 meningoteliosarcoma; 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 meningoteliosarcomatosi 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 meningoteliosarcomatoso 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 meningoteliosarcomatosi 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 angiomatici 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.

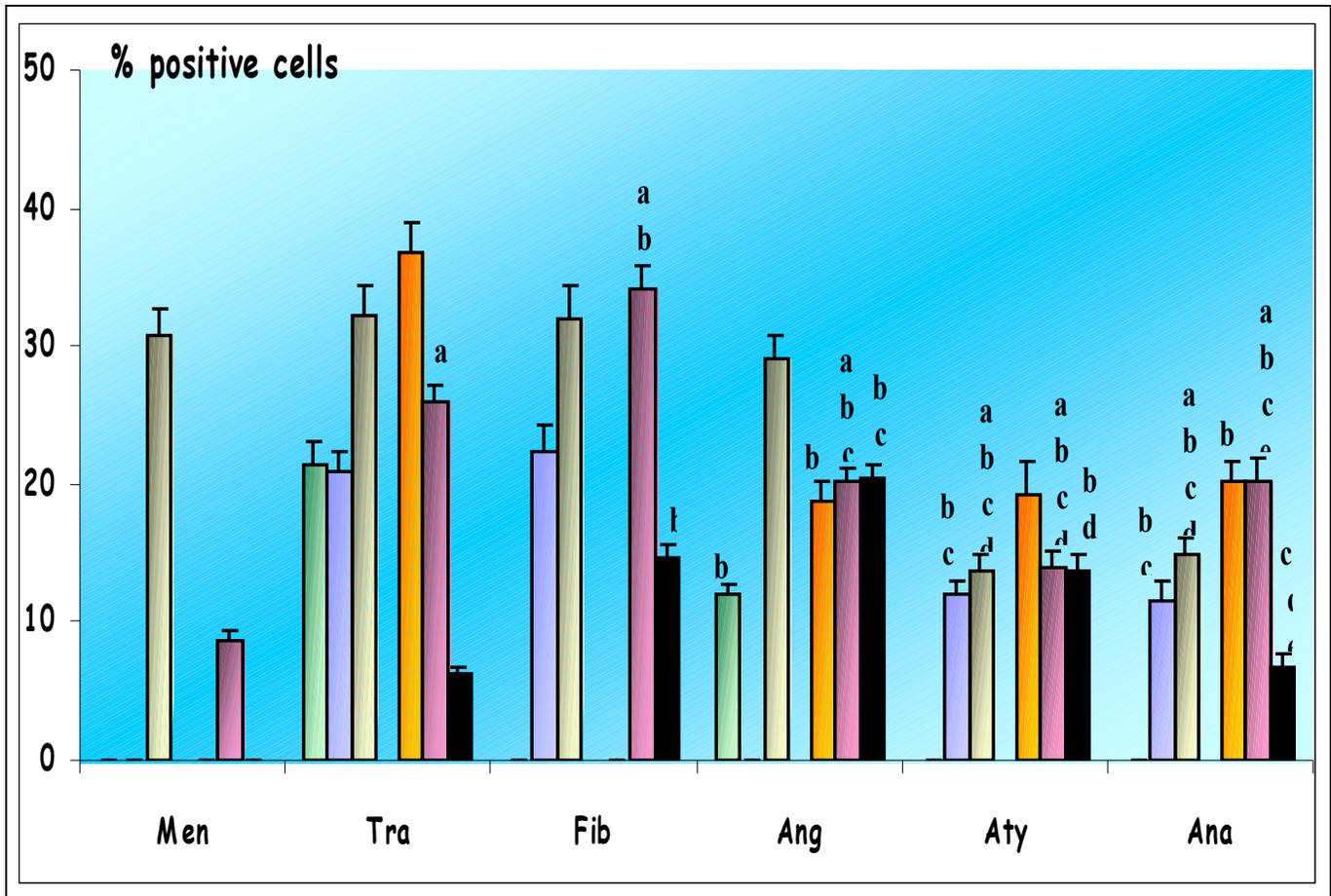


Fig 4. Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule positive alle reazioni immunoistochimiche nelle diverse tipologie tumorali. Men=meningoteliomatoso; Tra=transizionale; Fib=fibroso; Ang=angiomatoso; Aty=atipico; Ana=anaplastico.

Rosa: Bcl-2

Giallo-marrone: Caspasi-3

Nero: TUNEL + Caspasi-3

Verde: Caspasi-8

Arancione: Bax

Viola: Caspasi-9

Significatività per $p < 0,05$. a = vs. Meningoteliomatoso

b = vs. Transizionale

c = vs. Fibroso

d = vs. Angiomatoso

e = vs. Atipico

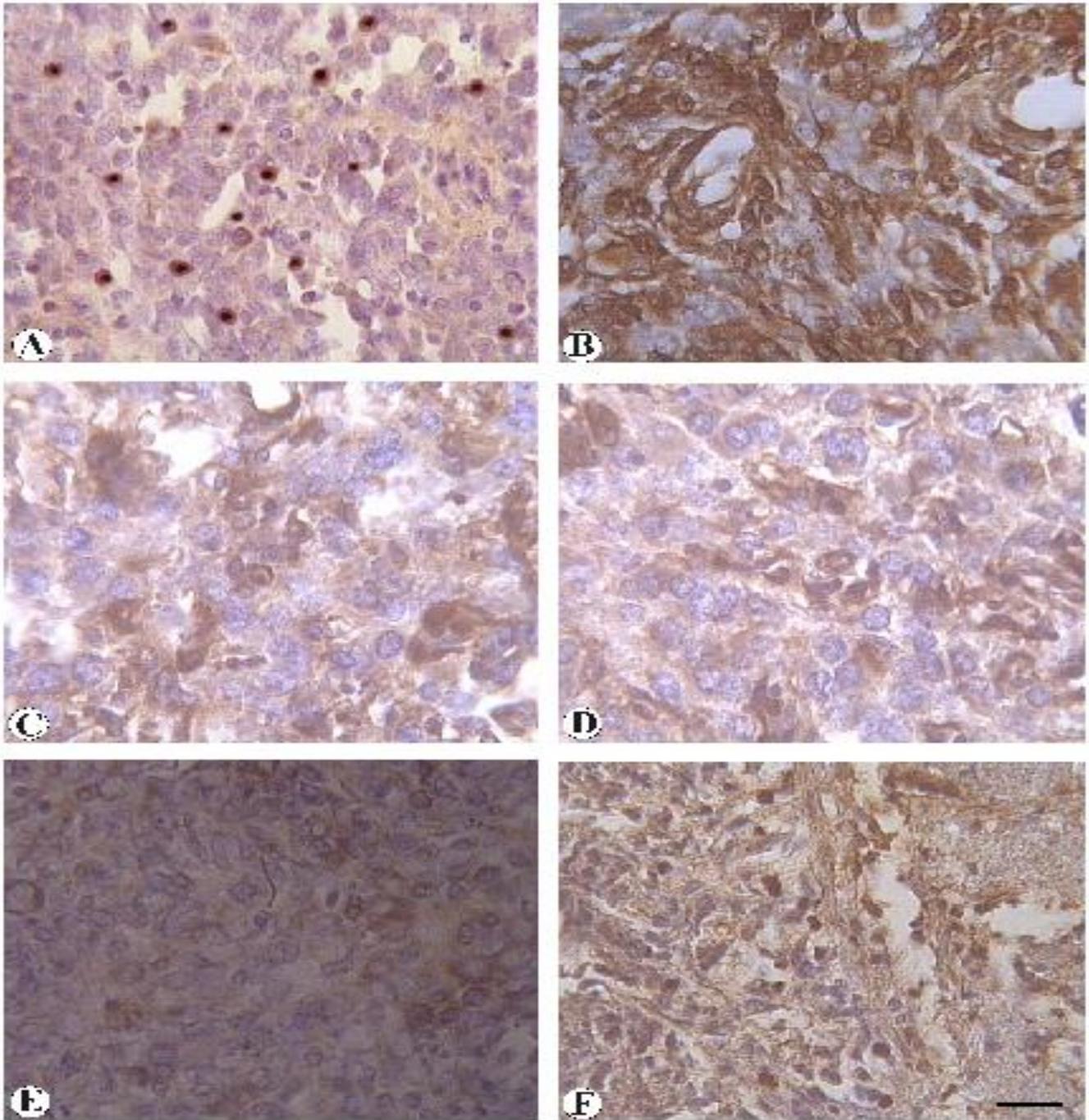


Fig 5. Immagini di reattività per i diversi fattori apoptotici studiati. A: doppia immunohistochemica TUNEL+caspasi-3 in mening. Anaplastico; B: caspasi-3 in mening. Meningoteliosomatoso; C: Bax in mening. Angiomatoso; D: caspasi-8 in mening. Angiomatoso; E: caspasi-9 in mening. Transizionale; F: infiltrazione 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).

	HISTOPATHOLOGIC CRITERIA OF TUMOR MASS GROWTH		
Meningioma grading	MIB 1 (Ki-67 nuclear antigen immunohistochemistry)	Mithotic index (N° /2.5 mm ²)	Leukocytes (N° /2.5 mm ²)
GRADE I	2 ± 1 %	2 ± 1	3 ± 1
GRADE II	11 ± 1 % *	9 ± 1 *	7 ± 2 *
GRADE III	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 meningotelomatoso, 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 meningotelomatoso 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 meningotelomatoso (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.

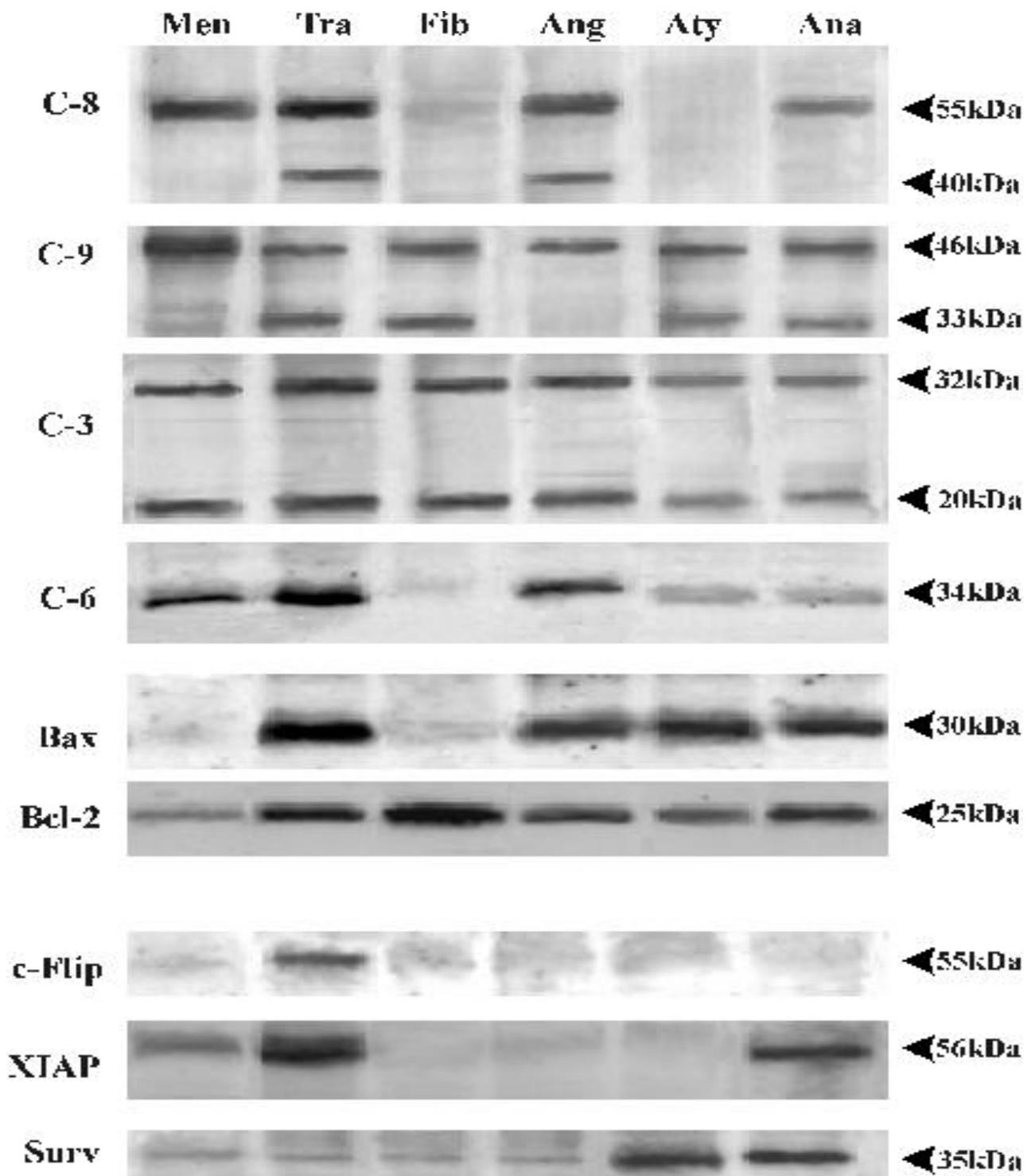


Fig.6. Analisi Western blot dell'espressione e dell'attivazione dei fattori apoptotici studiati. C=caspasi. Men=meningoteliosomatoso; Tra=transizionale; Fib=fibroso; Ang=angiomasomatoso; Aty=atipico; Ana=anaplastico.

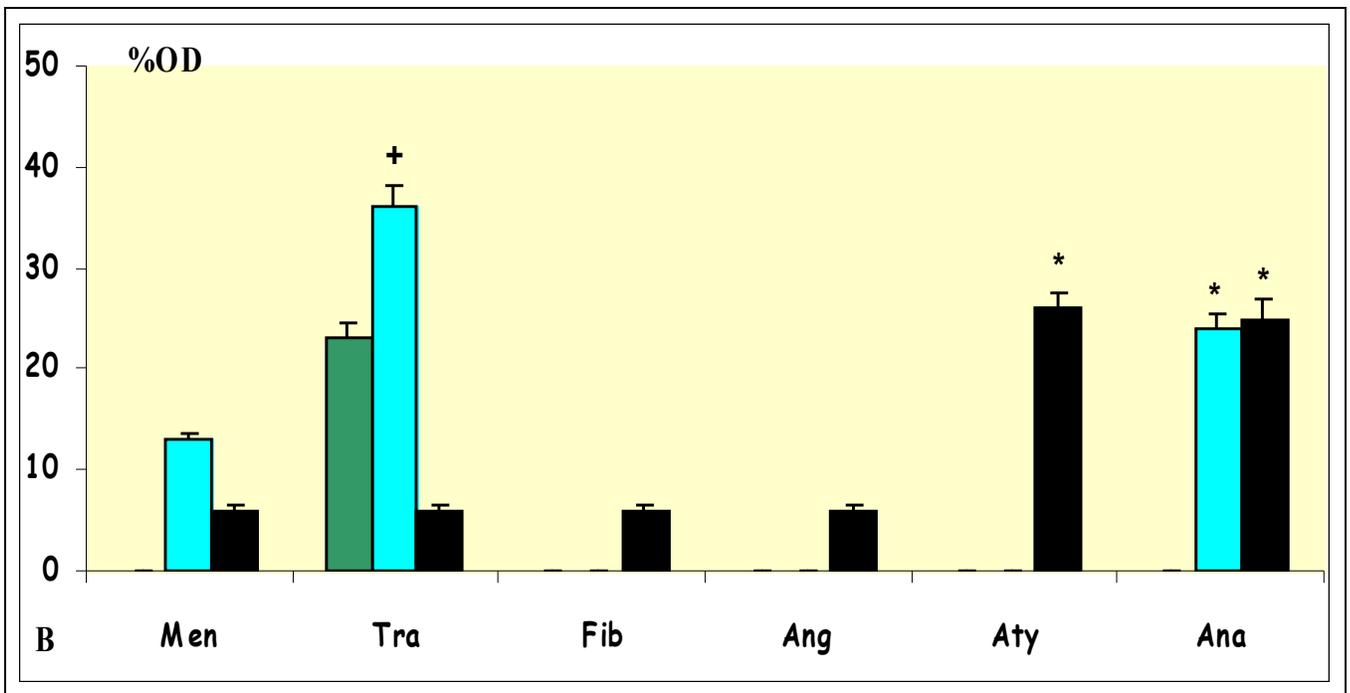
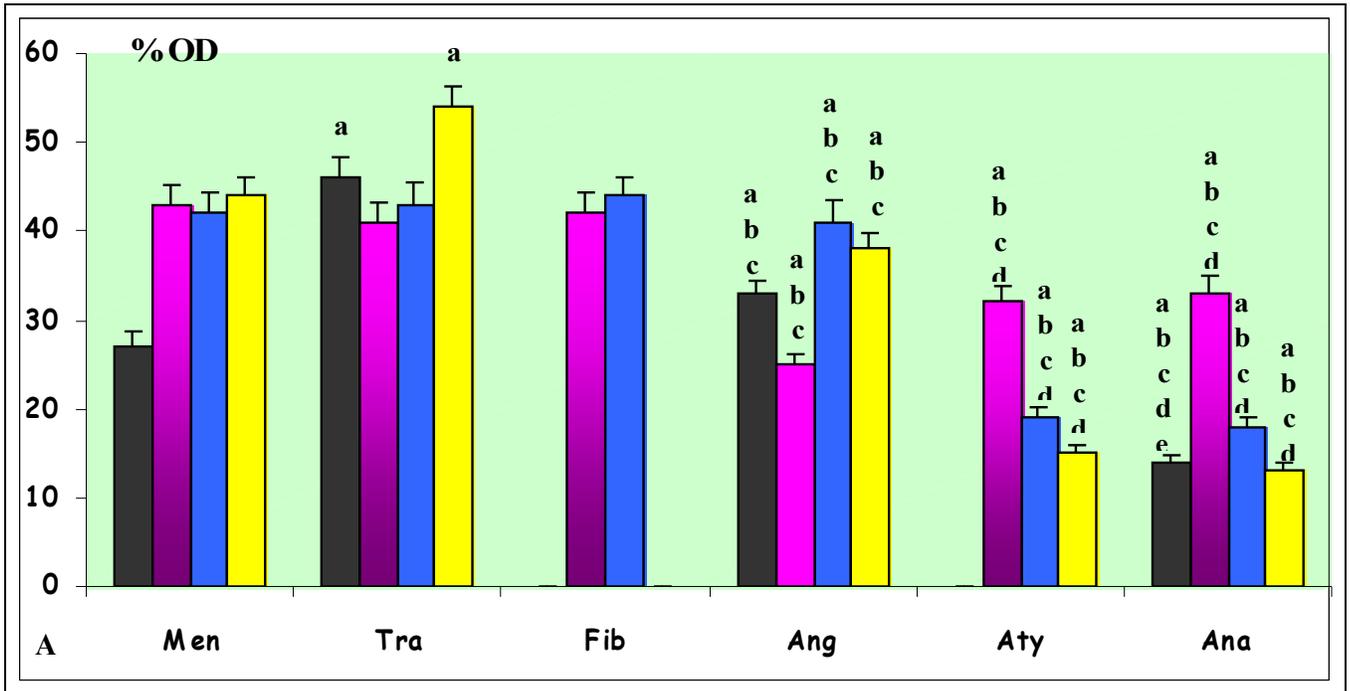


Fig.7. Istogramma a barre delle analisi densitometriche delle bande ottenute con Western blot. A: istogramma a barre delle caspasi; nero: procaspasi-8, rosa: procaspasi-9, blu: procaspasi-3, giallo: procaspasi-6.

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 meningoteliomatoso. Per spiegare le differenti attivazioni della caspasi-9 e della Bax nei

meningiomi fibromatosi e negli angiomasosi (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 meningoteliomatosi 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. È 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'inefficienza 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 meningoteliosomi; 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, Krammer 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, 2nd 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 and 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.

STUDIO DI CELLULE DI
NEUROBLASTOMA SK-N-BE SU
BIOVETRI DOPATI CON ZINCO.

INTRODUZIONE

NEUROBLASTOMA e CELLULE SK-N-BE

Il neuroblastoma è un tumore che colpisce le cellule nervose dei gangli simpatici. È considerato di origine ereditaria, ed è uno dei più frequenti nell'infanzia.

Questo fa parte di una più ampia famiglia di tumori che istologicamente originano dalle cellule del primitivo tessuto neuroectodermico della cresta neurale. Il neuroblastoma produce spesso catecolamine (per questo è detto secernente), determinandone alti livelli nelle urine e nel sangue, utili per la diagnosi. Può colpire soprattutto la ghiandola surrenale, presentandosi come una tumefazione addominale, i gangli simpatici paraspinali, potendo comparire in qualsiasi tratto della colonna vertebrale (addominale e toracica). Segni frequenti di malattia sono: febbre, anemia, disappetenza, ecchimosi intorno alle orbite. Le metastasi, frequenti e precoci, colpiscono le ossa, la regione dell'orbita, i linfonodi, il fegato e il midollo osseo. La diagnosi precoce è fondamentale, poiché se si interviene nei primi stadi di malattia la sopravvivenza è elevata; a tale fine vanno ricercati i metaboliti urinari delle catecolamine (acido vanilmandelico, acido omovanillico); va valutata l'estensione della malattia con indagini radiologiche standard, TAC, risonanza magnetica nucleare, urografia ed eventualmente mielografia; va eseguito, per confermare definitivamente la natura della malattia, un esame del midollo osseo e, se necessario, un prelievo biotico della massa neoplastica nella sede più facilmente aggredibile.

Sebbene sia molto raro, il neuroblastoma rappresenta tuttavia il tumore solido più frequente nei soggetti d'età inferiore ai cinque anni. Il NBL, infatti, costituisce il 7-10% di tutti i tumori solidi osservati in età pediatrica e presenta un'incidenza pari a circa 6.5-10.5 nuovi casi/anno/1.000.000 di soggetti d'età inferiore ai 15 anni, in Italia pari a 30 nuovi casi/anno. Il 93% dei NBL è diagnosticato prima dei 6 anni ed un terzo prima dell'anno di età. I casi diventano molto più rari nelle età successive e la diagnosi è

eccezionale nell'adolescente e nell'adulto (1). Le probabilità di guarigione (prognosi) e la scelta del trattamento dipendono dallo stadio del tumore (se si è diffuso ad altri organi), nonché dall'età del bambino all'atto della diagnosi, dalla localizzazione del tumore e dal risultato della biopsia con riferimento al tipo cellulare.

Terapia

Tutti i pazienti portatori di neuroblastoma possono essere sottoposti a trattamento.

Esistono quattro opzioni terapeutiche:

- chirurgia, che consiste nell'asportazione del tumore;
- radioterapia, che utilizza dosi elevate di raggi X per distruggere le cellule tumorali;
- chemioterapia, che consiste nella somministrazione di farmaci che distruggono le cellule tumorali;
- trapianto di midollo osseo, che ha lo scopo di sostituire il midollo osseo (malato) con midollo osseo sano.

Un tipo particolare di trapianto *autologo* utilizza le cellule *staminali* periferiche (cellule immature da cui originano tutte le cellule ematiche) del paziente.

Le SK-N-BE sono cellule di neuroblastoma e sono state isolate nel Novembre 1972 da una biopsia di midollo osseo di un bambino con neuroblastoma dopo ripetute sedute di chemio e radioterapia. Le cellule di neuroblastoma SK-N-BE presentano una morfologia variegata; alcune hanno lunghi processi altre sono di aspetto epiteliale. Inoltre possono formare aggregati e propagarsi in sospensione.

Come noto da letteratura, il trattamento di cellule di neuroblastoma con acido retinoico (Vitamina A) determina il loro differenziamento verso il fenotipo neuronale: le cellule cambiano morfologia con arborizzazione dendritica e formazione di sinapsi con cellule distanti, modificano l'espressione genica con aumento dell'espressione di geni neuronali,

proteine neuronali, neurotrasmettitori e mutano la loro attività biochimica (2). Le cellule SK-N-BE, in seguito a trattamento con acido retinoico, definiscono in membrana un pattern specifico di integrine che le rendono sensibili alle condizioni di adesione ambientale. Una tale proprietà non si nota in cellule SK-N-BE non trattate.

Struttura e funzione delle integrine

In condizioni normali, la sopravvivenza cellulare è la conseguenza di un complesso equilibrio tra cellule e matrice extracellulare e tra cellula e cellula. In particolare, l'interazione tra le cellule e le proteine della matrice extracellulare è essenziale per la sopravvivenza, la differenziazione ed il controllo della crescita cellulare (3). La perdita della capacità di adesione, come pure l'induzione di un' eccessiva adesività sono causa di diverse patologie.

Numerosi studi hanno portato ad identificare alcune proteine transmembrana come responsabili dell'adesione. Queste proteine sono state classificate in diversi gruppi (famiglie), sulla base di criteri strutturali e funzionali: integrine, caderine, selectine. La famiglia delle integrine è quella che principalmente esplica il controllo dei pattern cellulari che sovrintendono ai processi di sopravvivenza e differenziazione cellulare. Le integrine sono costituite da eterodimeri formati da subunità α e β (da 95.000 a 200.000 dalton), unite da legami non covalenti. La specificità di legame per ogni ligando dipende dal dominio extracellulare della subunità α . La subunità β è invece indispensabile per la funzionalità dell'integrina, presenta ripetizioni tandem di quattro regioni ricche di residui di cisteina, che sono considerate essenziali per il mantenimento della struttura tridimensionale della molecola.

Sul lato extracellulare le integrine uniscono proteine specifiche di matrice extracellulare al citoscheletro. Tra le proteine legate si trovano fibronectina, collagene I e laminina, ben note per le loro proprietà di stimolare la sopravvivenza e la differenziazione

cellulare. Le integrine si localizzano nelle placche focali, strutture adesive in cui avviene il contatto tra la matrice extracellulare ed i componenti del citoscheletro.

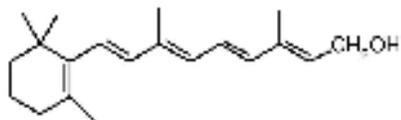
I collegamenti tra l'integrina, i legami nella matrice e i microfilamenti all'interno della cellula sono indiretti: essi sono connessi mediante proteine "armatura" come la talina, paxillina e l'alpha-actinina. Queste agiscono regolando le chinasi come le FAK (focal adhesion kinase - chinasi di adesione focale) e la famiglia delle chinasi Src ai substrati fosforilati come per esempio il p130CAS o reclutando adattatori di segnale.

Le integrine interagiscono anche con segnali provenienti dai recettori dei fattori di crescita solubili quali il VEGF, l' EGF e altri, determinando la decisione cellulare su quale azione biologica intraprendere: collegamento, movimento, morte o differenziazione.

Sul lato intracitoplasmatico le integrine interagiscono con il citoscheletro, requisito fondamentale sia per i fenomeni di adesione delle cellule alla matrice, sia per quelli di adesione tra le cellule stesse. La connessione modulabile con il citoscheletro fa aumentare la capacità di legame dell'integrina per il suo specifico ligando. Queste interazioni permettono alle cellule normali di avere la percezione diretta del profilo di adesione fornendo un segnale di sopravvivenza, la cui mancanza comporta la perdita del controllo del meccanismo di crescita cellulare e frequentemente la morte di tipo apoptotico. Alterazioni di tali interazioni possono d'altra parte attivare segnali intracellulari impropri che portano all'aumentata sopravvivenza e motilità che caratterizzano le cellule tumorali.

Da esperimenti condotti nel nostro laboratorio è noto che le cellule SKNBE trattate con acido retinoico esprimono in membrana un maggior numero di integrine adatte ai legami con proteine specifiche della matrice extracellulare quali collagene I, laminina, fibronectina, che mediano la sopravvivenza ed il differenziamento cellulare. In particolare sembra confermata l'aumentata espressione dell'integrina $\alpha\beta1$, ampiamente coinvolta nella formazione di legame specifico (3-4-5-6).

ACIDO RETINOICO



L'acido retinoico (RA) e in generale i retinoidi sono molecole segnale che, insieme ai loro recettori nucleari, stabiliscono dei networks di comunicazione genetica essenziali per lo sviluppo embrionale e per il mantenimento dello stato differenziato dei tessuti attraverso la regolazione della proliferazione, differenziamento e morte cellulare (7-8). I retinoidi, grazie al loro potere di condurre al differenziamento cellulare, offrono grandi potenzialità nella terapia del cancro.

L'Acido retinoico è un derivato della vitamina A e la sua principale funzione è quella di essere un "master regulator" dell'espressione genica. Solo una piccola porzione (0.2-5%) del retinolo presente nel plasma o nei tessuti viene convertita in acido retinoico all-trans (ATRA), il principale attivatore dei recettori per l'acido retinoico. Altri metaboliti con funzione di molecola segnale sono l'acido 9-cis RA e 13-cis RA. L'Acido Retinoico agisce mediante due tipi di recettori nucleari appartenenti alla famiglia dei recettori degli ormoni steroidei: RAR (Retinoic Acid Receptor) e RXR (Retinoic Receptor) (9-10). I recettori RAR, detti α , β e γ , funzionano da regolatori trascrizionali, una volta accesi regolano complessi proteici coattivatori che, legandosi al DNA, inducono la derepressione della cromatina e la successiva espressione dei geni RA-responsivi (11-12-13).

I RAR e gli RXR sono fattori di trascrizione che funzionano principalmente come RAR-RXR eterodimeri. Questi eterodimeri presentano due funzioni distinte: la prima è quella di modulare la trascrizione di geni target in seguito a binding con i RARE (Retinoic Acid

Response Element) presenti nei promoters di tali geni, la seconda consiste nel modificare l'efficienza di altri pathways attraverso meccanismi non ancora del tutto chiari. L'effetto di questo tipo più importante è senz'altro la repressione dell'attivazione trascrizionale mediata da AP-1. E' infatti anche grazie a questa inibizione che si può spiegare l'effetto anti-oncogenico dell'acido retinoico.

A livello molecolare l'Acido Retinoico è lipofilico e quindi diffonde facilmente attraverso la membrana cellulare; esso si lega e attiva gli RARs che inducono l'espressione di geni quali "Rho GTPase family genes" , coinvolti nella dinamica del citoscheletro, nello sviluppo, elongazione e guida dell'assone (Fig.1).

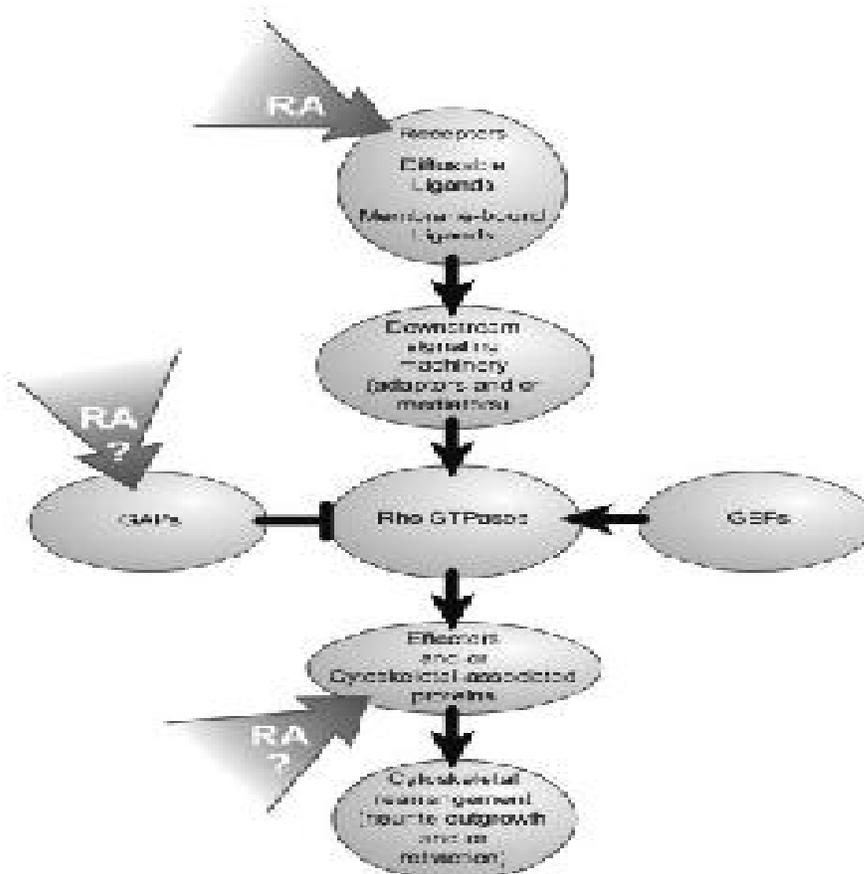


Fig. 1-Schema d'azione dell'acido retinoico

Funzioni dell'acido retinoico e dei recettori nucleari

Per quel che riguarda l'attività antitumorale dei retinoidi, bisogna considerare che esistono molti fattori che possono contribuire alla nascita di un tumore come ad esempio le modificazioni geniche o la carcinogenesi chimica. I retinoidi possono interferire con questi fattori su vari livelli (Fig.2):

- blocco della carcinogenesi chimica probabilmente grazie all'inibizione di AP-1.
- induzione e stabilizzazione del differenziamento.
- blocco del ciclo cellulare della cellula cancerogena in G1.
- effetto apoptotico post-maturazione.
- morte delle cellule premature ad opera solo di analoghi sintetici del retinolo (retinoids) in certe condizioni.
- induzione di apoptosi di cellule cancerogene (senza o in combinazione con agenti chemioterapici)

Le azioni principalmente note consistono nell'induzione del differenziamento e/o apoptosi di cellule tumorali e nell'inibizione della propagazione tumorale nei casi di cancro chimicamente indotti.

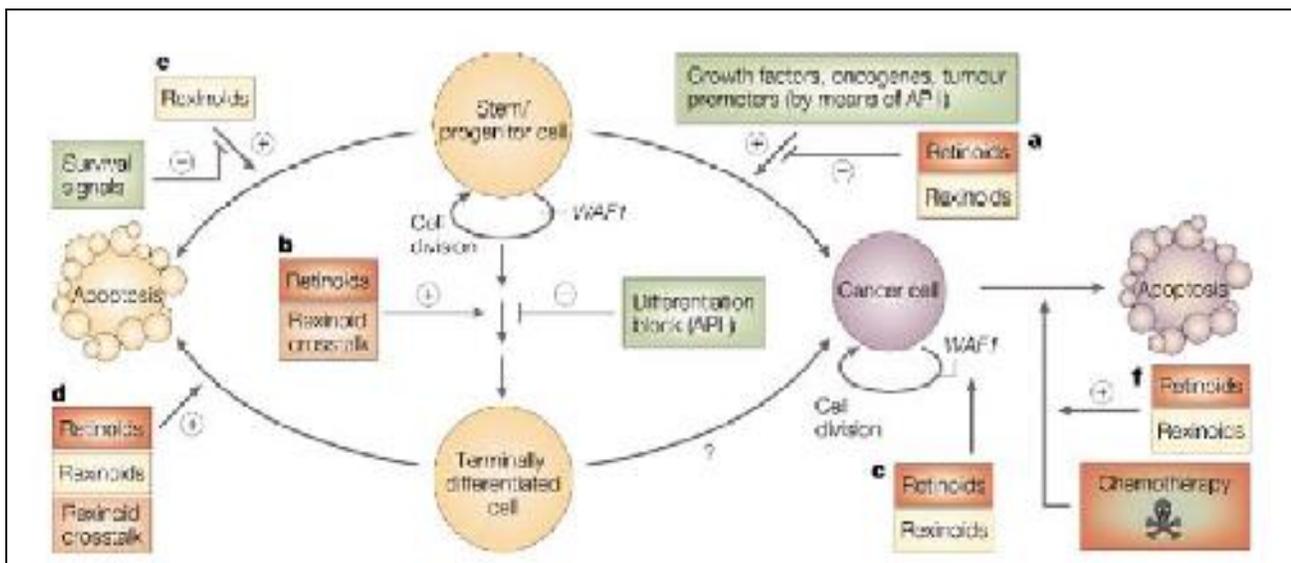


Fig.2-Schema azione retinoidi su apoptosi e cancerogenesi.

BIOMATERIALI

Oggi sono disponibili materiali che vengono utilizzati in applicazioni dentali ed ortopediche come sostituenti del tessuto osseo o come rivestimento di impianti metallici (14), in grado di facilitare l'adesione e la duplicazione cellulare e la formazione di matrice sulla superficie degli impianti stessi (15). Un esempio sono i Bioglass®, classificati come materiali bioattivi (o biomateriali).

Il concetto di vetro bioattivo fu introdotto per la prima volta nel 1971 con la sintesi del Bioglass 4555 da parte di L.L.Hench. Il Bioglass chimicamente è una ceramica vetrosa composta da:

- Biossido di silicio (45%)
- Ossido di Sodio (24,5%)
- Ossido di Calcio (24,5%)
- Pentossido di Fosforo (6%)

Tale biovetro fu sviluppato per soddisfare problematiche di impiantistica ossea, in quanto sulla superficie dei biovetri avvengono una serie di reazioni chimiche con formazione di uno strato di apatite idrossi-carbonato che favorisce la neoformazione di matrice ossea.

Da allora sono stati ampiamente studiati per applicazioni cliniche di molti altri materiali e vetri ceramici con composizione chimica simile (16). Il recente avvento di particolari tecniche di sintesi dei materiali ha permesso un maggior controllo delle strutture, delle superfici e della composizione dei vetri stessi, portandoli così a poter essere utilizzati per applicazioni più specifiche.

Tra le tante è stata studiata la parziale sostituzione del sodio con zinco nei vetri bioattivi per stimolare la proliferazione e la differenziazione cellulare (17): lo zinco infatti è un elemento fondamentale per la crescita, la proliferazione ed il differenziamento cellulare, sebbene i meccanismi biochimici in cui è coinvolto non siano

ancora del tutto chiari (18). Lo zinco è un cofattore per molti enzimi, ed un segnale intracellulare esso stesso, stimola la sintesi proteica ed è un metallo fondamentale per la replicazione del DNA (19). Inoltre dal punto di vista strettamente chimico-fisico prolunga la durezza dei materiali ritardandone la dissoluzione e le reazioni in ambiente acquoso (come nei liquidi biologici) incrementando le proprietà meccaniche dei materiali stessi (20).

Per tutti questi motivi sono stati recentemente sintetizzati dei nuovi materiali bioattivi chiamati "HZ" , dalla composizione chimica simile a quella del materiale 45S5 di Hench, ma con, in più, quantità differenti di zinco sottoforma di ZnO (21). In particolare questi biovetri contengono il 5%, 10% e 20% w/w di zinco nella loro composizione chimica rispetto al Bioglass 45S5 (Tab.1).

	ZnO (%w/w)	SiO ₂ (%w/w)	Na ₂ O (%w/w)	CaO (%w/w)	P ₂ O ₅ (%w/w)
45S5 (H)	-	44.75	24.43	24.50	5.93
HZ5	4.94	42.54	23.27	23.40	5.64
HZ10	10.05	40.44	22.08	22.02	5.39
HZ20	20.13	37.14	18.75	18.86	4.64

Tab.1- Composizione chimica dei diversi materiali

Chimicamente lo ione Zn²⁺ presenta due comuni geometrie di coordinazione nelle specie ossigenate, tetraedrica ed ottaedrica. Da recenti studi condotti su questi materiali si è osservato che aumentando lo Zinco totale (ZnO) al biomateriale iniziale di Hench, si ha una diminuzione della concentrazione di zinco in forma tetraedrica a vantaggio di quella ottaedrica, che finisce con il conferire ai materiali caratteristiche di impaccamento sempre più consistenti a seconda della concentrazione dello zinco stesso (21). Le analisi dei modelli atomici hanno mostrato che lo zinco, essendo molto impaccato nella rete strutturale dei materiali, non viene di fatto rilasciato in soluzione, nei tempi normalmente

utilizzati in esperimenti di adesione e proliferazione cellulare (22). Il rilascio di Zinco si osserva invece su tempi molto più lunghi in funzione della concentrazione di zinco nel materiale, divenendo, in questo caso direttamente, un potenziale determinante delle fenomenologie biologiche osservate in interazione con i materiali suddetti (23-24-25).

INTERAZIONE BIOMATERIALE - LIQUIDO BIOLOGICO

Dobbiamo considerare che quando parliamo di adesione di cellule su biomateriali non si intende un'adesione diretta della cellula sulla superficie del materiale, ma di adesione mediata da profili di adesione proteica.

E' noto infatti che i materiali in ambiente biologico sono soggetti ad interazione adesiva diretta con le proteine mobili proprie dell'ambiente stesso (sangue, liquido interstiziale). Le stesse sono inoltre soggette, in fase di adesione, a fenomenologie dinamiche tempo dipendenti, che interessano la loro struttura, quantità, qualità, funzione biologica. Inoltre le cellule stesse inducono in fase adesiva la produzione di molecole specifiche di matrice, quale collagene I e fibronectina.

Il comportamento delle proteine sulla superficie gioca un ruolo cruciale nel determinare la natura dell'interfaccia nei confronti delle cellule in adesione e possono influenzare anche le proprietà e la degradazione della superficie stessa del biomateriale.

La cellula in realtà interagisce con la copertura proteica e non con la superficie propria del biomateriale. Pertanto le differenti modifiche di interazione che il materiale induce sulle proteine in diretta adesione diventa pertanto l'effettivo fattore inducente e dispiegante il comportamento cellulare.

SCOPO DEL LAVORO

Il primo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il grado di adesione e proliferazione delle cellule di linea di neuroblastoma SKNBE e di quelle differenziate con Acido Retinoico (R.A.) a contatto con vetri bioattivi di Hench, dopo aver valutato il livello di adsorbimento proteico alle superfici dei diversi materiali utilizzati.

Scopo del lavoro è stato anche quello di studiare l'espressione di alcuni marker neuronali (Neurofilamento-L, Gap-43 e β IIIITubulina) delle due tipologie cellulari adese ai biovetri, per verificare l'interazione di questi materiali definiti bioattivi sulla maturazione del fenotipo differenziato indotto da R.A..

Successivamente si è pensato di verificare se questi biomateriali potessero indurre processi apoptotici nelle cellule andando a valutare sia l'espressione della caspasi-3 e della caspasi-9 nelle cellule staccate dai materiali, sia l'espressione di Akt e pAkt (quali segnali di sopravvivenza) nelle cellule adese. Sulle cellule staccate dai biovetri sono state fatte anche analisi per valutare se siano interessate vie di morte necrotica.

Sono stati utilizzati sia i biovetri privi di zinco (H) sia i biovetri contenenti diverse concentrazioni di zinco (HZ5, HZ10 e HZ20) al fine di determinare un'eventuale relazione tra l'indice di adesione-crescita cellulare ed il contenuto di zinco nei materiali stessi.

Sono tuttora in corso studi per verificare se una diversa espressione (qualitativa e quantitativa) di integrine di membrana possa aiutare la comprensione delle differenze osservate fino ad ora.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI E MATERIALI DI HENCH

Nello studio sperimentale dei biomateriali l'interazione cellulare ha il suo primo rilievo nei profili di adesione e di proliferazione. Il primo parametro misura l'interazione diretta della cellula sul biomateriale e fornisce informazione sulle proprietà biologiche del materiale stesso. Si ottiene misurando quante cellule rimangono adese a tempi prestabiliti al substrato in analisi. La proliferazione misura invece la presenza di condizioni di tossicità (più facilmente rilevabili nei limiti che la proliferazione cellulare si pone), quindi la capacità delle cellule di trovare sul materiale un ambito più o meno favorente il proprio sviluppo biologico. Da un punto di vista tecnico lo studio della proliferazione cellulare si misura in tempi più lunghi e si compone sia del numero di cellule che inizialmente seminate hanno sviluppato adesione, sia del numero di neocellule che a seguito di proliferazione hanno saputo sviluppare adesione.

Le cellule SKNBE sono state coltivate con terreno di coltura "Dulbecco modified Eagle's medium" (DMEM) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FCS), antibiotici (5% streptomina, glutammina e penicillina) e mantenute a 37°C e al 5% di CO₂.

Queste cellule sono state trattate con all-trans-retinoic acid (RA, Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA) 10µM fino ad un massimo di 20 giorni, con periodica sostituzione del mezzo ed aggiunta di acido retinoico.

I materiali di Hench da noi utilizzati presenti sotto forma di dischi di vetro, sono stati sottoposti alla misurazione dell'area di superficie tramite programma d'analisi d'immagine Leica Qwin e successivamente sterilizzati. Nota l'area superficiale si è potuto seminare un'esatta quantità di cellule sulla superficie di ogni materiale; in particolare, in questo lavoro, sono state piastrate 40.000 cell/cm² per gli esperimenti di adesione cellulare e

20.000 cell/cm² per quelli di proliferazione. Le cellule trattate con acido retinoico utilizzate in questo lavoro sono state differenziate per 10 giorni; questo perché è stato precedentemente riscontrato, con un tale tempo, un livello di differenziamento e di integrità cellulare ottimale per i propositi del presente lavoro.

Le cellule SKNBE e SKNBE+RA sono state seminate a goccia e lasciate a contatto con i materiali per diversi intervalli di tempo: 1, 3, 6 e 12 ore per gli esperimenti di adesione su superficie; 24, 48 e 72 ore per quelli di proliferazione, con adeguata aggiunta di terreno di coltura dopo le prime ore di incubazione. Questi intervalli di tempo sono stati scelti in base a precedenti lavori di adesione e proliferazione condotti su plastica, utilizzata poi anche nel presente lavoro come controllo (26).

Per ciascuna condizione sperimentale siamo andati a valutare: vitalità cellulare delle cellule sui materiali (MTT test), morfologia delle cellule (Arancio di Acridina), espressione di marker neuronali e fattori apoptotici (Western Blot).

ADSORBIMENTO PROTEICO

L'adsorbimento definisce il processo attraverso il quale eventuali molecole "aderiscono" ad una superficie solida.

Per determinare l'adsorbimento è stata prima calcolata l'area totale dei materiali da testare con il programma di analisi di immagine (Leica Qwin), successivamente è stato centrifugato il siero e prelevato il surnatante. Dopo aver diluito in acqua deionizzata il surnatante in rapporto 1:4, è stata scelta una quantità di liquido da utilizzare che andasse a coprire l'intero materiale (nel nostro caso 200 μ l/cm² a goccia), quindi i materiali sono stati posti in incubatore. Sono stati valutati i livelli di adsorbimento proteico dopo 1, 3 e 6 ore di incubazione. Dopo aver aspirato il liquido e lavato con PBS, i materiali sono stati trattati con SDS bollente (100 μ l per superficie circa) al fine di

staccare le proteine adsorbite, le proteine successivamente evidenziate tramite elettroforesi e silver staining ed analizzate qualitativamente e quantitativamente.

Il silver staining consiste nell'evidenziare in modo aspecifico, tramite precipitazione di sali d'argento, le bande proteiche ottenute con corsa elettroforetica. Queste sono state analizzate nella loro identità qualitativa tramite scale graduate di pesi molecolari.

L'aspetto quantitativo delle proteine evidenziate è stato determinato tramite analisi densitometrica semiquantitativa (cioè analisi di variazione di riferimento al controllo), delle bande evidenziate.

MTT TEST

La vitalità cellulare è stata misurata con il test del MTT, un metodo di valutazione dell'attività mitocondriale; sono stati aggiunti 100 µl/ml di soluzione madre di MTT (5mg/ml in PBS) direttamente nel terreno di coltura a contatto con i materiali, per due ore a 37°C. Successivamente è stato asportato il terreno e sono stati lentamente aggiunti 100 µl di DMSO direttamente sui materiali seminati. Il DMSO è in grado di sciogliere i sali di formazano che si formano in corrispondenza delle cellule in seguito all'aggiunta di MTT assumendo color viola-porpora a seconda della vitalità cellulare. Più le cellule sono vitali più la soluzione di DMSO appare colorata. Successivamente è stata fatta una lettura spettrofotometrica a 590 nm dei campioni ottenuti. I dati ottenuti sono stati normalizzati tramite una curva di taratura sperimentale.

Per singolo gruppo sperimentale i valori sono stati riportati come media ± Errore Standard della Media ed evidenziati nei grafici riportati. L'analisi statistica è stata condotta con test della varianza (ANOVA), con livello di significatività posto a $p < 0.05$.

ARANCIO DI ACRIDINA

Per visualizzare la morfologia delle cellule adese sulla superficie dei materiali, microscopicamente non regolarmente liscia, abbiamo utilizzato una colorazione fluorescente utilizzando l'arancio di acridina. L'arancio di acridina è un colorante-intercalante specifico per la distinzione cromatica di DNA e RNA. Intercalandosi al primo emette fluorescenza di lunghezza d'onda pari a 525 nm, cioè di colore giallo-verde (indicando attività metabolica), mentre per l'RNA si parla di 650 nm, cioè luce rossa-arancione (indicando uno stato cellulare quiescente).

Ai tempi sperimentali prestabiliti, le cellule sono state fissate ai materiali dopo asportazione del terreno di coltura e due lavaggi in PBS. La fissazione è avvenuta a caldo in stufa, mettendo i materiali a 60°C per 20 minuti.

Successivamente è stata fatta una colorazione con Arancio di Acridina (soluzione al 0,025% in PBS) e le cellule sono state quindi osservate al microscopio a fluorescenza.

WESTERN BLOT

E' stata valutata, tramite western blot, l'espressione di proteine riconosciute come marker di controllo della maturazione morfologico-funzionale dei prolungamenti (simil neuronali) delle cellule in studio. Dopo 24 ore di adesione ai materiali, le cellule seminate (40.000 cell/cm²) sono state lisate con SDS bollente a 95°C. Contemporaneamente è stato fatto il lisato anche sul pellet ottenuto dalla precipitazione delle cellule rimaste nel terreno di coltura, al fine di valutare se processi apoptotici fossero coinvolti nella morte delle stesse cellule. In entrambi i casi, il contenuto proteico totale è stato stimato con la tecnica BCA (Pierce, Rockford, IL, USA).

Sono stati fatti esperimenti per valutare l'espressione di β III tubulina (Rabbit monoclonal antibody, Covance, Berkeley, California), del Neurofilamento (NF-L (N-14), Goat polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, INC) e di GAP-43 (GAP-43 (H-100)

rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, INC) sia nelle cellule SKNBE sia nelle SKNBE+RA adese alla plastica di controllo ed ai materiali in esame.

Sono stati caricati 10 µg di proteine di ciascun campione per la corsa elettroforetica su un gel doppio al 10% 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 5% di siero bovino per un'ora e successivamente incubate overnight con gli anticorpi I precedentemente elencati. Tali anticorpi sono stati rilevati con substrati chemiluminescenti (ECL, Amersham International, Little Chalfont, U.K.) coniugati con perossidasi di rafano anti rabbit/goat (Sigma, St. Luis, MI, U.S.A.).

Western blot sono stati eseguiti anche per valutare la presenza o meno di marker apoptotici, quali le 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), e la caspasi-3 (rabbit policlonal antibody, clone Asp-175; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A), sui lisati ottenuti dalle cellule staccate dai materiali presenti nel terreno di coltura e su quelli ottenuti dalle cellule adese. Inoltre è stata valutata anche l'espressione di proteine quali Akt (rabbit Akt antibody, Chelbio) e pAkt (Rabbit PhosphoAkt, Chelbio) come espressione della sopravvivenza cellulare sui biovetri.

TRYPAN BLUE

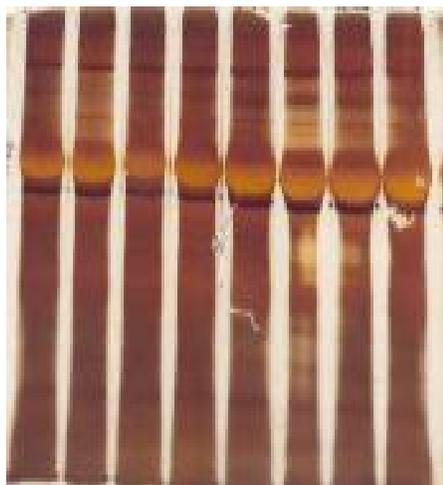
Le cellule staccate dai materiali sono state prelevate assieme al terreno di coltura e su di esse è stato fatto il test del Trypan Blue 0,4%. Tale test evidenzia le cellule danneggiate, in quanto la colorazione blu permea attraverso le membrane cellulari. Nel caso in cui ci fosse morte cellulare di tipo necrotico (quindi con lisi della membrana cellulare, condizione che non si verifica in caso di morte apoptotica), le cellule appaiono come strutture tondeggianti blu se osservate al microscopio. Per questo esperimento le cellule sono state

sospese nella soluzione di Trypan Blu e successivamente contate al microscopio attraverso l'utilizzo di camera di burker.

RISULTATI

ADSORBIMENTO PROTEICO

Nell'analisi delle proteine adsorbite ai materiali abbiamo osservato che questi dopo 1, 3 e 6 ore sono colonizzati dall'albumina, che si presenta come la proteina che maggiormente riveste la superficie del materiale. Le diverse composizioni in zinco non influenzano né la natura dell'adesione proteica, né la quantità della stessa (Fig.3). E' stato osservato che la quantità di proteine adsorbite dopo un'ora è equivalente alla quantità di proteine adsorbite ai materiali nei tempi successivi.



Albumina 69 KDa

H HZ5 HZ10 HZ20

Fig. 3. Silver staining dell'adsorbimento proteico ai materiali dopo un'ora.

CELLULE SK-N-BE

Per quanto riguarda le cellule di linea SK-N-BE i risultati che abbiamo ottenuto sono stati espressi con i grafici riportati di seguito (Fig.4-Fig.5). Come si può osservare dai dati ottenuti dalla lettura spettrofotometrica del test del MTT, le cellule SK-N-BE risultano aderire ai materiali in modo significativo già dopo un'ora di incubazione, in tutti i materiali dopati con zinco abbiamo osservato un numero di cellule adese statisticamente superiore rispetto al vetro di Hench senza zinco (H) (Fig.4).

Dopo tre ore di incubazione invece osserviamo una diminuzione del numero di cellule in adesione, proporzionalmente più evidente con l'aumento della concentrazione di zinco. Un simile andamento non si osserva su H dove il numero delle cellule adese rimane costante tra 1 e 3 ore. Il trend di riduzione del numero di cellule adese continua a riproporsi anche dopo sei ore di incubazione su tutti i materiali testati, raggiungendo livelli simili nei vari materiali, con l'eccezione di HZ20 dove tale riduzione si fa statisticamente più evidente (Fig.4).

Dopo 12 ore, ultimo intervallo di tempo valido per i profili di adesione, si osserva una notevole ripresa del numero di cellule adese su tutti i campioni considerati, con valori simili sui diversi materiali testati.

L'analisi dei profili di proliferazione (Fig.5), ci ha mostrato un numero di cellule adese inferiore del 50% rispetto alla quantità di cellule inizialmente seminate sui vari materiali, con un livello particolarmente basso sul materiale HZ20. Tra le 24 e le 48 ore il numero di cellule individuate appaiono influenzate dal contenuto di zinco dei materiali. Osserviamo un incremento del numero di cellule su H e HZ5, che rimane costante su HZ10 rispetto al numero contato a 24 ore, per mostrarsi significativamente ridotto su HZ20. Spingendo la nostra osservazione a 72 ore c'è il conservarsi del numero di cellule già individuato, che solo in HZ20 riveliamo ulteriormente ridotto (Fig.5).

Alle cellule adese ai materiali, a tutti gli intervalli di tempo considerati, sono state fatte colorazioni con Arancio di Acridina, al fine di valutare la morfologia delle cellule seminate e verificare un'eventuale alterazione strutturale delle stesse al prolungarsi del tempo di adesione.

La morfologia evidenziata presenta un profilo cellulare che si caratterizza come liscio e circolare; la stessa non sembra variare nel tempo e nemmeno a seconda del materiale su cui le cellule vengono seminate. Le cellule SK-N-BE tendono a formare piccoli aggregati tra loro, abbiamo notato, a seguito di osservazioni qualitative, una diminuzione apparentemente proporzionale nella densità distributiva e aggregatrice, con l'aumento della concentrazione di zinco; ad evidenziare una probabile influenza specifica della superficie sull'adesione cellulare.

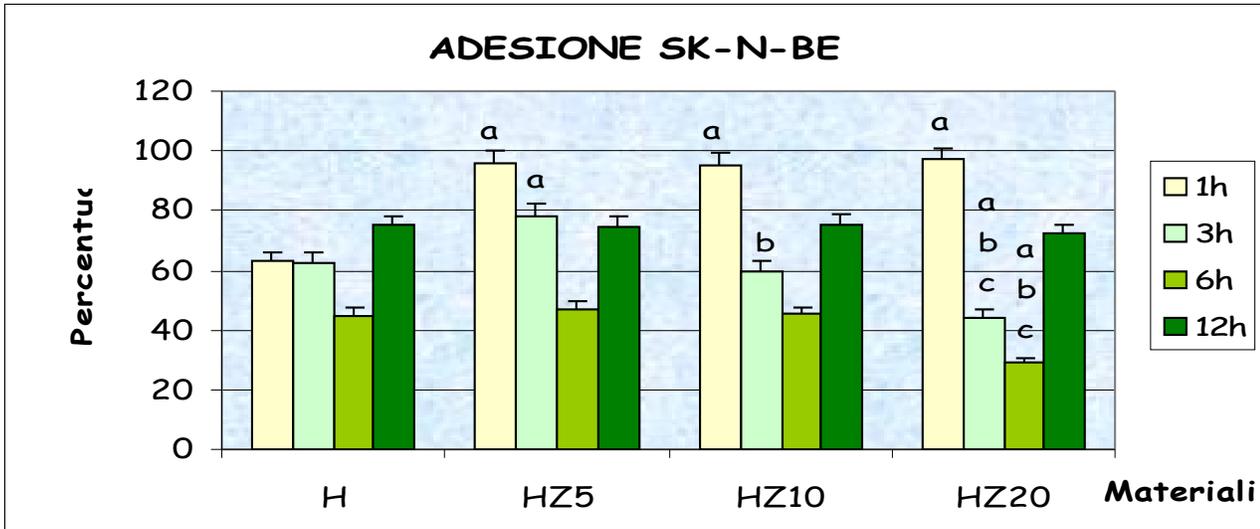


Fig.4 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE in adesione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione.
 Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10
 La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di egual misura.

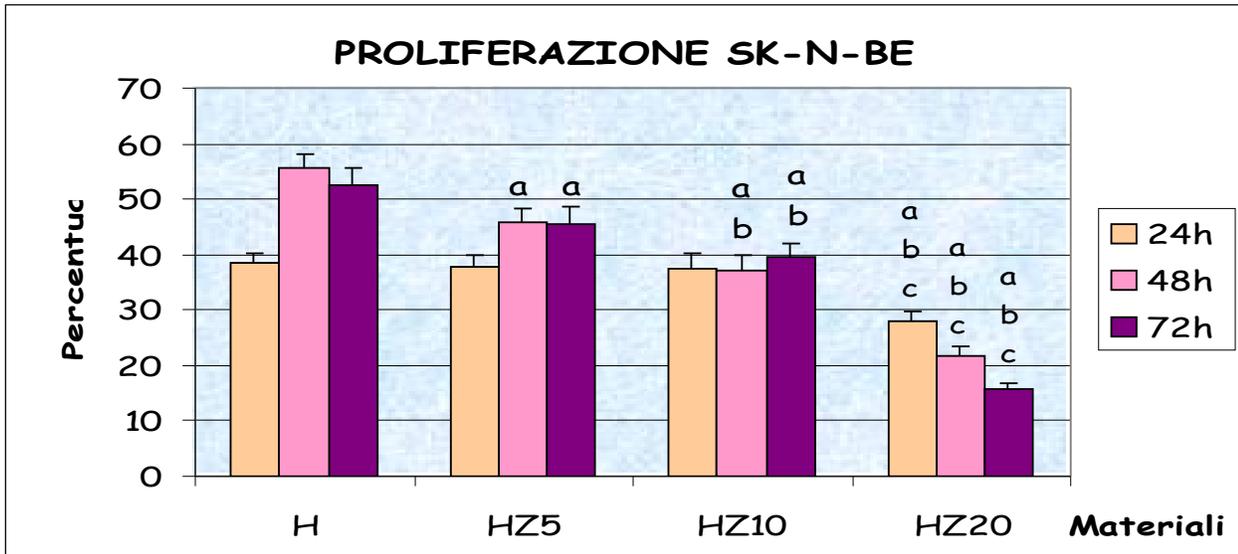


Fig.5 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE in proliferazione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione.
 Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10
 La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di egual misura.

CELLULE SK-N-BE + R.A.

I dati ottenuti sulle cellule SK-N-BE trattate con Acido Retinoico per 10 giorni sono rappresentati in Fig.6 ed in Fig.7.

Come si può osservare dal grafico relativo all'adesione cellulare (Fig.6), la percentuale di cellule che già dopo un'ora di incubazione rimangono adese ai materiali è particolarmente elevata, con valori quasi prossimi al 80%, sia su H sia su tutti i materiali dopati con zinco. Nelle ore successive su H, HZ5 e HZ10 abbiamo osservato una diminuzione progressiva fino ad arrivare, dopo 12 ore di coltura, a valori poco più elevati del 40% rispetto alle iniziali cellule seminate.

Su HZ20 invece abbiamo osservato una adesione costante per le prime 3 ore, quindi diversamente da quanto osservato per gli altri materiali, abbiamo osservato un incremento a 6 ore seguito da una drastica diminuzione delle cellule adese a 12 ore, con livelli raggiunti simili a quelli riscontrabili sugli altri materiali (Fig. 6).

Per quanto riguarda i tempi di proliferazione (Fig.7), i dati ottenuti sono molto più eterogenei e di andamento contrario rispetto ai corrispondenti dati ottenuti con le SK-N-BE non trattate con Acido Retinoico. A 24 ore di incubazione abbiamo osservato una netta risposta positiva data dall'alta percentuale di cellule adese. Mentre nei tempi successivi su H si riscontra una progressiva riduzione del numero di cellule, sugli altri materiali abbiamo osservato un incremento proporzionale alla concentrazione di zinco tra le 24 e le 48 ore. Su HZ10 e HZ20, tenuto conto della spinta proliferativa, abbiamo registrato perfino un aumento del numero delle cellule superiore a quello inizialmente seminato. Dopo 72 ore di coltura però abbiamo registrato una drastica diminuzione del numero di cellule vitali, con percentuale di cellule finale corrispondente a circa il 60%, significativamente superiore comunque a quella ottenuta su H.

Come per le SK-N-BE, anche per le cellule differenziate con Acido Retinoico, sono state fatte colorazioni con Arancio di Acridina, su tutti i materiali e a tutti gli intervalli di

tempo considerati, al fine di valutare la morfologia delle cellule seminate ma tale colorazione non ha dimostrato particolari differenze rispetto alle SK-N-BE.

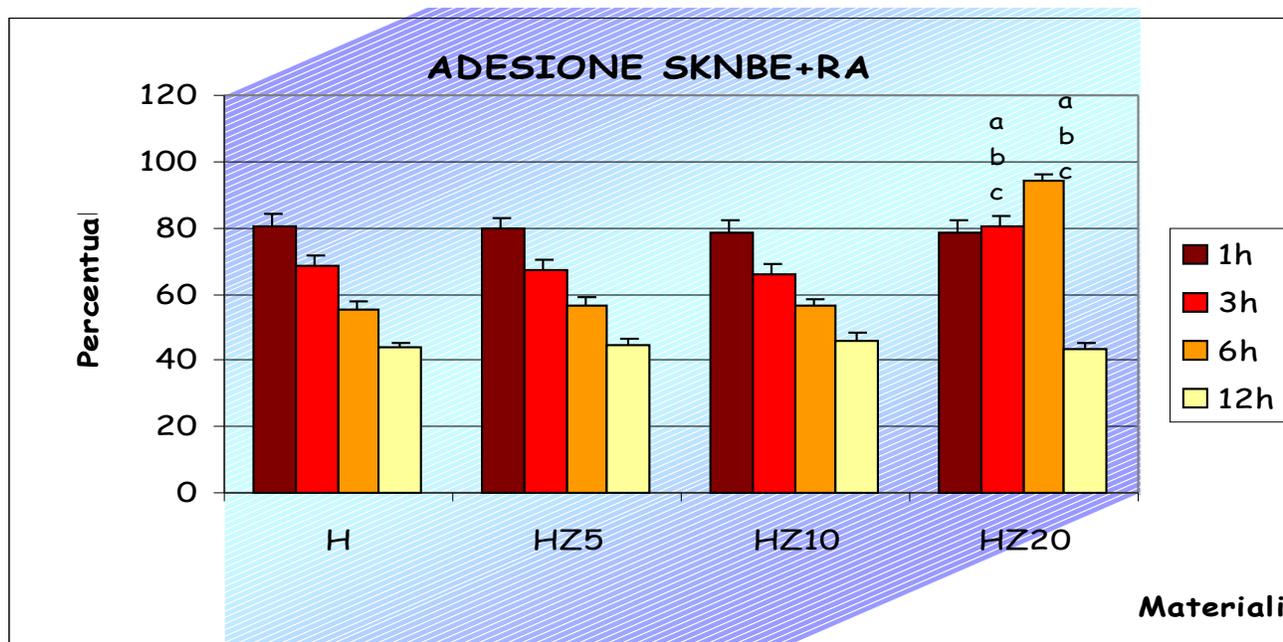


Fig.6 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE + R.A in adesione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione. Significatività per $p < 0.05$.

a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di egual misura.

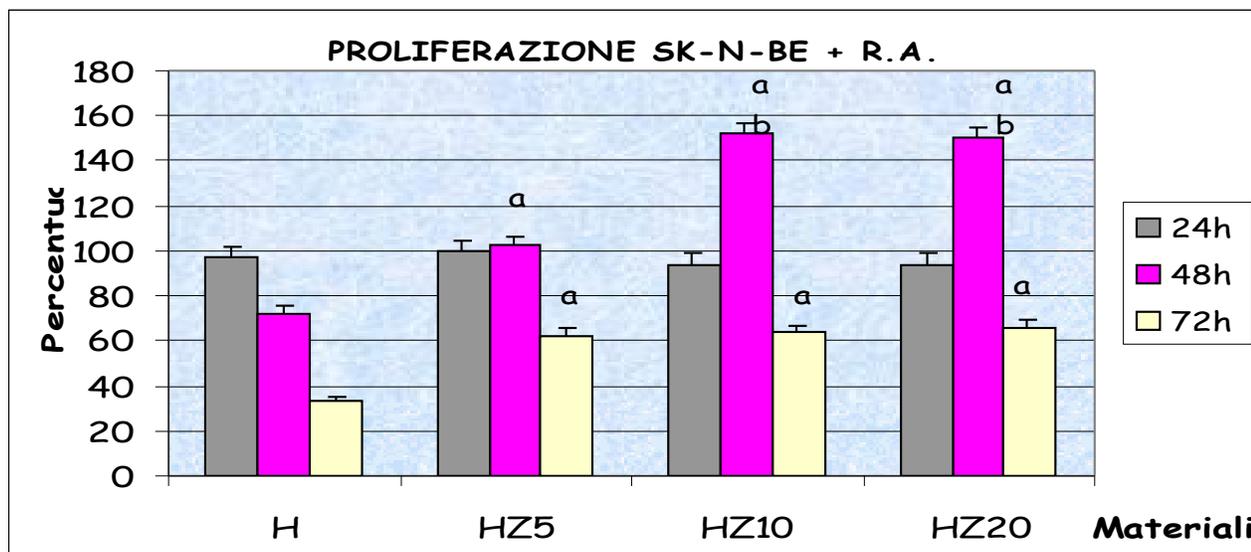


Fig.7 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE + R.A. in proliferazione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione. Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di egual misura.

Come detto in precedenza scopo del lavoro è stato anche quello di studiare l'espressione di alcuni marker neuronali (quali il Neurofilamento-L, Gap-43 e β III Tubulina) delle due tipologie cellulari adese ai biovetri, per verificare l'interazione di questi materiali definiti bioattivi sulla maturazione del fenotipo differenziato indotto da R.A.. I risultati ottenuti sono i seguenti.

NEUROFILAMENTO (NF-L)

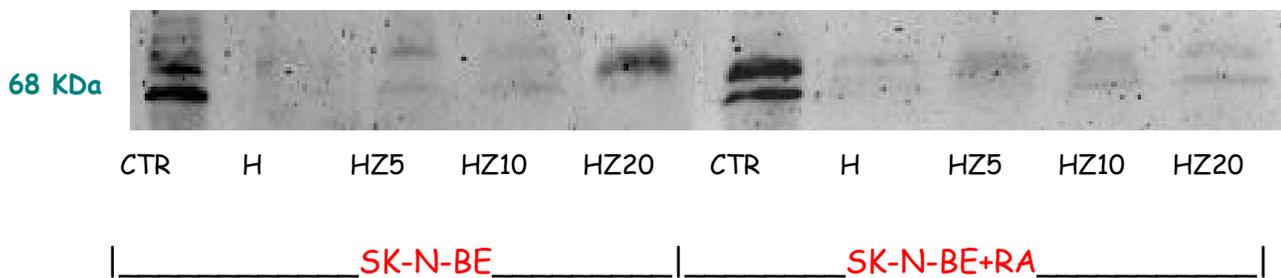


Fig.8. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti al Neurofilamento-L, M.W.=68 KDa.

Come si può osservare in Fig.8, Western Blot hanno evidenziato la presenza di bande relative al Neurofilamento-L (M.W.=68 KDa) nettamente evidenti in corrispondenza dei controlli su plastica, sia per le SKNBE sia per SKNBE+RA. I lisati delle cellule adese ai materiali hanno invece evidenziato bande meno marcate soprattutto per quanto riguarda le cellule di neuroblastoma non trattate con acido retinoico, ad eccezione che su HZ20.

GAP-43

43 KDa

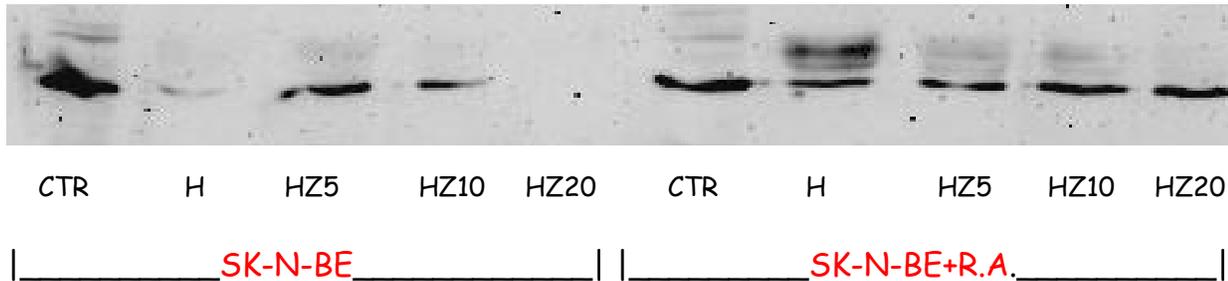


Fig.9. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti al Gap-43, M.W.= 43 KDa.

Come si osserva in questa immagine di Western Blot, Gap-43, proteina che risiede alla base del cono di elongazione del neurite, è altamente espressa nelle cellule adese alla plastica di controllo, specialmente per quanto concerne le cellule SKNBE+RA. Questa tipologia cellulare esprime livelli evidenti di questa proteina anche in adesione sui materiali, espressione meno accentuata invece nelle SKNBE in adesione sui biovetri. Dato questo che conforta il nostro studio perché ci dimostra che le SKNBE trattate con acido retinoico a contatto con i vetri di Hench non subiscono delle limitazioni al differenziamento verso il fenotipo neuronale.

βIII TUBULINA

I risultati ottenuti da Western Blot per questa proteina non hanno dato risultati positivi sui lisati cellulari di SKNBE adese ai diversi materiali considerati, mentre i lisati delle cellule trattate con acido retinoico hanno evidenziato delle bande molto poco significative in corrispondenza della βIII Tubulina. Siamo in attesa di compiere un nuovo esperimento per evidenziare una maggiore discriminazione tra le due diverse tipologie cellulari a contatto con i biovetri.

Western blot sono stati eseguiti anche per valutare la presenza di marker apoptotici, quali la Caspasi-3, la Caspasi-8 e la Caspasi-9 nelle loro forme attivate, sia sulle cellule adese ai materiali sia su quelle distaccate, in entrambe le tipologie cellulari.

CASPASI 3

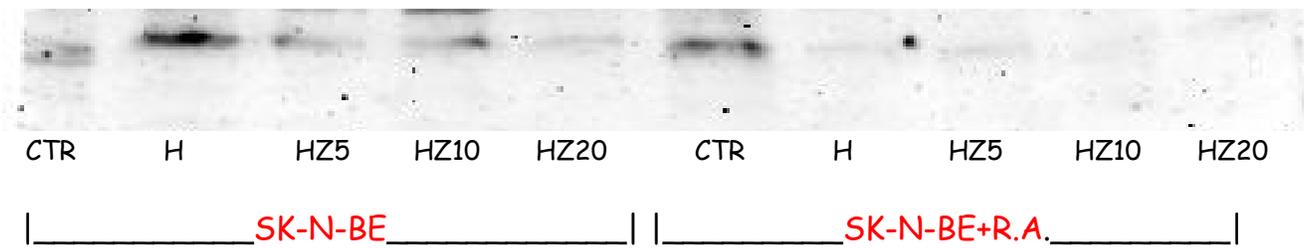


Fig.10. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti alla Pro-Cas3, M.W=32KDa.

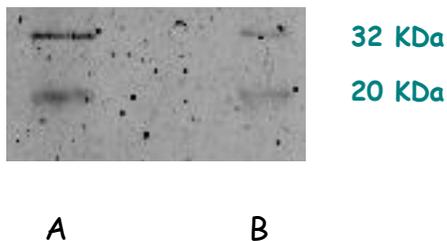


Fig.11. Western blot di lisati cellulari di SKNBE+RA (A) e di SKNBE (B) staccate dai materiali. Bande corrispondenti alla Pro-Cas3, M.W=32KDa, ed alla forma attiva di Cas-3, M.W.=20KDa.

Come si può osservare dalla Fig.10 sono state riscontrate delle bande di positività alla proforma della Caspasi-3 soprattutto nelle SKNBE adese ad H, rispetto alle stesse cellule su materiali a concentrazione maggiore di zinco. Le SKNBE+RA invece hanno dato segnali molto meno evidenti e significativamente inferiori al segnale dato dalle stesse cellule sulla plastica di controllo.

Come si osserva in Fig.11 invece, le SKNBE+RA che hanno dato luogo a distacco dai substrati di adesione hanno evidenziato nettamente la presenza di Cas-3 sia nella sua

proforma (32KDa) sia nella sua forma attiva (20KDa); segnali presenti ma significativamente molto inferiori per quanto riguarda le SKNBE.

CASPASI 8

Western blot sono stati eseguiti sui lisati di SKNBE ed SKNBE+RA, sia adese sia distaccate dai materiali, per evidenziare la presenza di Caspasi-8 ma in entrambi i casi i risultati sono stati negativi. Le cellule non esprimono Caspasi-8 nemmeno sotto l'aspetto della pro-forma.

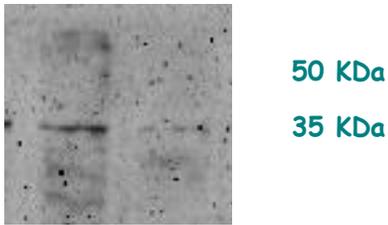
CASPASI 9

I risultati dei Western blot hanno messo in evidenza (Fig.12) un segnale alquanto basso per quanto concerne la proforma della Caspasi-9 (50KDa) nelle SKNBE e nelle SKNBE+RA adese ai materiali. Assente un segnale di positività alla Caspasi-9 nella sua forma attivata.



Fig.12. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti alla Pro-Cas9, M.W=50KDa.

Per quanto riguarda le cellule distaccate dai materiali, le SKNBE+RA hanno evidenziato positività per la proforma della Cas-9 ed anche un leggero segnale per la forma attiva. Significativamente inferiori i segnali ottenuti sulle SKNBE (Fig.13).



A B

Fig.13. Western blot di lisati cellulari di SKNBE+RA (A) e di SKNBE (B) staccate dai materiali. Bande corrispondenti alla Pro-Cas9, M.W.=50KDa, ed alla forma attiva di Cas-9, M.W.=35KDa.

Dopo aver ottenuto i risultati mostrati in precedenza riguardo all'espressione dei marker apoptotici, il passo successivo è stato quello di valutare se le cellule staccate dai materiali risultassero positive al test del Trypan Blue, al fine di osservare se tale distacco fosse correlato ad un tipo di morte necrotica.

La conta al microscopio delle cellule di colore blu, e quindi con lisi della membrana cellulare, ha portato ai seguenti risultati. Meno del 10% delle cellule SKNBE staccate dai materiali ha dato segnale positivo al test del Tripan Blue, in particolare valori molto bassi si sono riscontrati sulle cellule staccate da H e da HZ5, leggermente più alti i valori ottenuti nelle SKNBE staccate da HZ10 ed HZ20. Per ciò che riguarda le cellule trattate con acido retinoico invece abbiamo ottenuto risultati differenti, con una percentuale di cellule in fase necrotica pari a circa al 25% rispetto al totale delle SKNBE+RA staccate dai materiali. In questo caso la percentuale delle cellule necrotiche è risultata essere praticamente equivalente su H, HZ5 ed HZ10 mentre su HZ20 si è riscontrato che praticamente la metà delle cellule staccate dal materiale era in fase necrotica (Tab.2).

	SKNBE	SKNE + R.A.
H	5,5 ± 0,4 %	20 ± 1,8 %
HZ5	1,1 ± 0,1 %	14,3 ± 1,4 %
HZ10	12,5 ± 1,3 %	18,4 ± 1,7 %
HZ20	11,1 ± 0,9 %	48,4 ± 4,5 %

Tab.2 - Valori relativi alla percentuale di cellule necrotiche rispetto al totale di cellule distaccate dai materiali.

I dati mostrati fino ad ora hanno portato poi l'attenzione sulla ricerca di qualcosa che potesse verificare il "tentativo" delle cellule adese ai materiali di sopravvivere. L'analisi delle caspasi nelle cellule adese ai materiali hanno messo in evidenza una maggiore presenza di caspasi-3 rispetto alle altre investigate (cas-8 e cas-9), caspasi che comunque potrebbe anche essere coinvolta in processi proliferativi e non necessariamente in quelli apoptotici. Da qui la ricerca della presenza di Akt, proteina legata alla sopravvivenza cellulare. I risultati ottenuti sono mostrati in Fig.14

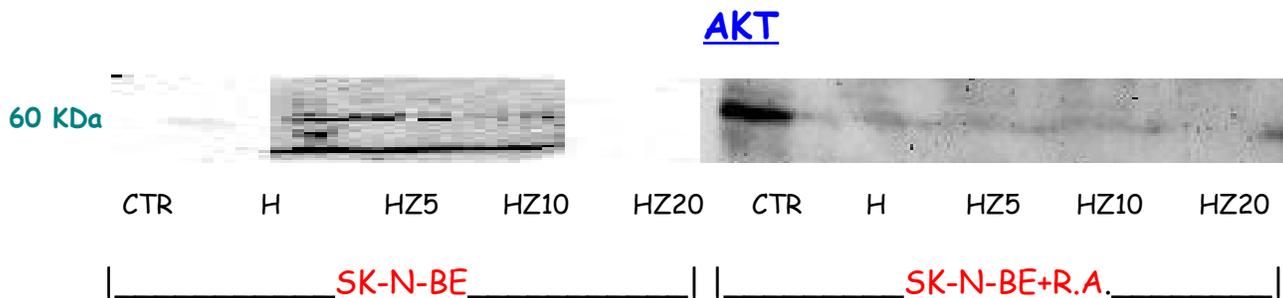


Fig.14. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali. Bande corrispondenti ad Akt, M.W.= 60 KDa.

Come si può osservare da queste immagini la via biochimica di Akt/pAkt è ampiamente utilizzato come segnale di sopravvivenza. In particolare le SKNBE mostrano una certa

attivazione della pAkt mentre le SKNBE+RA mostrano un'ampia espressione della pAkt. Poiché pAkt è da considerarsi come l'effettivo segnale di sopravvivenza cellulare, dal confronto dei dati, emerge che le SKNBE+RA adese ai biomateriali attivano fortemente il segnale di sopravvivenza più che non quelle adese su plastica (CTR). Questa osservazione è compatibile con la presenza di un'alta popolazione cellulare di SKNBE+RA adese ai materiali a 24 ore come si osserva in Fig.10.

DISCUSSIONE

I materiali da noi trattati sono substrati che, come detto in precedenza, presentano una struttura chimica piuttosto complessa, in cui gli ioni coinvolti tendono a formare strutture cristalline impaccate. L'impaccamento aumenta in modo proporzionale all'aumento di zinco nei diversi materiali, determinando una distribuzione complessiva di carica superficiale sempre meno evidente con l'aumento di zinco. H infatti presenta una carica superficiale complessiva positiva data da ioni Na^+ mobili, meno presenti negli altri materiali dove lo ione zinco, sotto forma di Zn^{2-} (ZnO_4)²⁻, oltre a rendere la struttura più compatta, immobilizza e bilancia la carica degli ioni Na^+ . Questo fatto ha la sua importanza considerando che le cellule prediligono per l'adesione ambienti con prevalenza di cariche negative, mentre gioca a sfavore la presenza di cariche positive.

Fattore non trascurabile per le fenomenologie di adesione cellulare è la caratteristica liscia/ rugosa della superficie. Da analisi condotte su diversi modelli sperimentali si è notato che superfici rugose (rugosità micro-strutturata) meglio dispongono le cellule all'adesione. L'analisi di superficie dei biovetri zincati ha evidenziato che l'aumento della concentrazione di zinco favorisce la microstrutturazione della rugosità di superficie (23).

L'interazione delle proteine dell'ambiente biologico è un fattore che precede ed influenza grandemente l'adesione cellulare. Abbiamo osservato che tale reazione su tutti i materiali testati dava luogo al medesimo quadro adesivo che vede coinvolta l'albumina con livelli quantitativi comparabili tra i diversi materiali. Anche se l'uso delle tecniche di indagine fin qui adottate non ci consente di verificarlo direttamente, le cellule tendono a produrre proteine di matrice per agevolare la propria adesione.

I risultati eterogenei di adesione cellulare osservati nel presente lavoro ci dispongono a cercare anche in tale fenomenologia una possibile spiegazione di quanto osservato.

SK-N-BE NON TRATTATE CON ACIDO RETINOICO

Noi pensiamo che l'elevata percentuale di cellule SK-N-BE adese ai materiali osservata dopo solo un'ora di adesione potrebbe essere il risultato di una semplice interazione di carica tra le molecole di superficie cellulare e la superficie stessa dei materiali; un'ora è un tempo troppo breve perché le cellule possano esprimere legami specifici che presuppongono adeguamenti intracitoplasmatici. Inoltre il fatto che le SK-N-BE adese al vetro di Hench originale (H) siano, dopo un'ora, in percentuale inferiori a quelle adese sugli altri materiali, dà sostegno all'ipotesi che su H una più diffusa presenza di ioni Na^+ liberi disturbi la fase iniziale dell'adesione cellulare. Quindi i materiali dopati con zinco offrono, con la diminuita presenza di cariche positive libere, una condizione più favorevole all'adesione cellulare.

La susseguente diminuzione rapida e generalizzata delle cellule adese dopo tre e sei ore di incubazione, a nostro parere, potrebbe invece trovare spiegazione nel subentrare di vie metaboliche, che coinvolgono l'espressione di substrati specifici stabilizzanti la sopravvivenza cellulare e che la conseguente assenza di tali substrati specifici porti le cellule al distacco. Di fatto abbiamo osservato come la diversa percentuale di zinco contenuta nei materiali non rappresenta un fattore determinante per questo comportamento cellulare, che in effetti si riscontra costante su tutti i materiali testati nel nostro studio.

Sorprendentemente dopo 12 ore di coltura si è osservato invece un incremento del numero di cellule in adesione, su tutti i materiali. Con i risultati sperimentali in nostro possesso, non sappiamo se questo fenomeno ha alla sua base l'acquisizione di forme di adesione specifiche da matrice extra-cellulare neoprodotta non ancora presente a 3 e 6 ore di adesione.

Comunque osservazioni di altri autori (24-25) hanno evidenziato che diverse tipologie cellulari seminate sui materiali di Hench e sui derivati dopati con zinco, mostrano, a partire da 12 ore di coltura, una buona morfologia di crescita, con proteine d'adesione

(quali la vinculina) ampiamente espresse, in modo proporzionale alla concentrazione di zinco nei materiali.

Su tutti i materiali abbiamo osservato una drastica diminuzione di cellule a 24 ore, quando i processi proliferativi dovrebbero iniziare a prendere campo sui processi adesivi stessi.

Quanto osservato potrebbe trovare spiegazione nel fatto che le cellule, per potersi duplicare, necessitano di definire una labilizzazione dei contatti adesivi. Di conseguenza, in una situazione adesiva non ottimale, gli eventi di proliferazione realizzano ulteriori difficoltà nello stabilizzare l'adesione cellulare.

Le cellule rimaste adese ai materiali vanno comunque incontro al progredire dei processi proliferativi sui biovetri su H e HZ5, dove si riscontra un aumento di cellule dopo 48 ore. Evidenziando che su questi materiali le SK-N-BE troverebbero condizioni proliferative accettabili, a differenza di quanto succede su HZ10 e HZ20 dove la proliferazione è limitata (HZ10) o addirittura sfavorita (HZ20). Questa osservazione indicherebbe che più alte concentrazioni di zinco, e quindi di impaccamento della struttura, rappresenti in sé un fattore sfavorevole alla proliferazione cellulare.

Dobbiamo tener conto del fatto che in queste cellule lo stato non differenziato lascia ipotizzare la presenza in membrana di fattori di adesione aspecifici che su lungo tempo non favoriscono i processi di adesione cellulare.

SK-N-BE TRATTATE CON ACIDO RETINOICO

Le analisi di Western Blot hanno evidenziato che entrambe le tipologie cellulari da noi considerate esprimono, su un substrato di controllo (superficie delle piastre da coltura), le proteine β III-tubulina, GAP-43 e Neurofilamento, considerate tra i markers fondamentali del fenotipo neuronale. Questo ci indica che la differenziazione ottenuta

con acido retinoico non indurrebbe cambi sostanziali nelle proteine cellulari di tipo strutturale.

Queste cellule, come precedentemente descritto, presentano un'espressione più ampia e diversificata delle integrine di membrana, che vedono un'ampia espressione dell'integrina $\alpha 1\beta 1$ a fornire dimeri specifici per l'adesione a proteine di matrice extracellulare quali il fibronectina, laminina o collagene.

Anche nelle cellule SKNBE trattate con acido retinoico si osserva una elevata percentuale di cellule adese ai materiali dopo un'ora di incubazione. Di nuovo, il dato potrebbe trovare spiegazione in un' interazione di carica tra cellule e substrato. Dove il più alto numero di cellule in adesione osservato rispetto alle SKNBE non trattate potrebbe trovare supporto anche nella più ampia espressione di proteine di superficie, capaci di assecondare interazioni iniziali di tipo aspecifico.

Quindi nei successivi tempi di adesione (3, 6, 12 ore) si osserva una proporzionale riduzione del numero di cellule adese. Questo dato potrebbe essere coerente con l'impossibilità da parte delle integrine di trovare substrati di legame specifico che giustifichino la stabilizzazione delle cellule in adesione portando ad un progressivo distacco delle cellule.

Apparentemente discordante con le ipotesi sopra avanzate sono invece le osservazioni ottenute su biovetri HZ20, dove è invece un aumento delle cellule adese il fenomeno rilevante soprattutto dopo 6 ore. Poiché come si è sopra ricordato lo strato di adesione proteica è costante qualitativamente (albumina) e quantitativamente, la spiegazione va di nuovo cercata nelle condizioni intrinseche generate dalla struttura dei materiali. L'elevato impaccamento e immobilizzazione delle cariche positive (Na^+) dovrebbe fornire la spiegazione al fenomeno, che comunque evolve dopo 12 ore di adesione nelle stesse condizioni di quanto già osservato con gli altri materiali. Analizzando i profili di proliferazione (numero di cellule adese tra 24 e 72 ore) abbiamo per H la ripetizione di

profili già osservati in adesione; la presenza di zinco favorisce la numerosità cellulare entro le 48 ore seguita da una brusca riduzione apprezzabile dopo 72 ore.

Da qui ipotizziamo che le condizioni offerte dai materiali dopati con zinco offrano forse alle integrine (nella misura in cui queste definiscano la reale differenza all'interazione adesiva sui biomateriali nel caso delle cellule SKNBE-RA) una iniziale capacità di interazione più stabile, comunque imperfetta come dimostrerebbe l'evoluzione verso il distacco cellulare nei tempi più lunghi.

Sono stati condotti studi per determinare se le cellule che si distaccano dai materiali vanno incontro a morte apoptotica. I Western Blot fatti sui lisati cellulari ottenuti da cellule adese ai materiali e cellule distaccatesi presenti nei terreni di coltura hanno dato risultato negativo all'attivazione della caspasi -8 e -9. Questi risultati metterebbero in evidenza che le cellule che si distaccano dai materiali non lo fanno conseguentemente all'occorrenza di processi apoptotici, ma il loro distacco sarebbe quindi solo condizionato dalle dinamiche di interazione relative alla stabilizzazione dell'adesione cellulare. Stiamo ancora valutando i processi legati alla morte cellulare, unitamente ai risultati ottenuti dall'analisi delle caspasi e ai risultati del Trypan Blue. Non siamo in grado ad oggi di dare una corretta giustificazione ai segnali di positività ottenuti per la caspasi-3, questa potrebbe essere legata a processi apoptotici così come potrebbe essere coinvolta nei sistemi proliferativi.

Sono infatti in corso approfondimenti relativi allo studio delle vie metaboliche intracellulari potenzialmente coinvolte nei processi di stabilizzazione/ destabilizzazione dell'adesione cellulare.

Sebbene si debbano ancora compiere esperimenti per approfondire e spiegare ulteriormente quanto osservato fino ad ora, dai dati che possediamo possiamo concludere comunque quanto segue.

Superfici inorganiche contenenti zinco, esprimenti diversi livelli di impaccamento cristallino sono in grado di definire diverse interazioni funzionali con elementi biologici dell'adesione cellulare.

L'espressione di integrine di adesione, quale è noto verificarsi nelle cellule differenziate, diventa un fattore dominante nel comportamento adesivo delle cellule su di una superficie, che tiene conto anche del rifiuto all'adesione sicuramente su tempi lunghi (72 ore).

Altri fattori potrebbero essere coinvolti nell'adesione iniziale, forse in qualche modo correlati all'espressione delle integrine, che giustifichino il migliore profilo adesivo cui le SKNBE+RA hanno dato luogo.

BIBLIOGRAFIA

1. Brodeur GM 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203-216
2. Chambaut-Guerin AM, Martinez MC, Hamimi C, Gauthereau X, Nunez J. Tumor necrosis factor receptors in neuroblastoma SKNBE cells and their regulation by retinoic acid. *J Neurochem.* 1995 Aug;65(2):537-44.
3. Bozzo C, Sabbatini M, Tiberio R, Piffanelli V, Santoro C, Cannas M., Activation of caspase-8 triggers anoikis in human neuroblastoma cells, *Neurosci Res.* 2006 Oct;56(2):145-53. Epub 2006 Jul 25.
4. Bozzo C, Lombardi G, Santoro C, Canonico PL, Involvement of beta(1) integrin in betaAP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells, *Mol Cell Neurosci.* 2004 Jan;25(1):1-8.
5. Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F, Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions, *Exp Cell Res.* 1997 Dec 15;237(2):326-37.
6. Bozzo C, Defilippi P, Silengo L, Tarone G, Role of tyrosine phosphorylation in matrix-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma cells, *Exp Cell Res.* 1994 Sep;214(1):313-22.
7. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.*, 5: 2924-2933, 1991.
8. Mendelsohn C., Lohnes D., Decimo D., Lufkin T., LeMeur M., Chambon P., and Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*, 120: 2749-2771, 1994.
9. Mangelsdorf D. J., and Evans R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850, 1995.
10. Zhang, X. K., and Pfahl, M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 4: 156-162, 1993.

11. Aranda A, Pascual A 2001 Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
12. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. 2006 International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58:712-725
13. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H 2006 International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58:760-772
14. T. Kokubo, H.M. Kim and M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials* **24** (2003), pp. 2161-2175.
15. D.E. Steflik, R.S. Corpe, F.T. Lake, T.R. Young, A.L. Sisk, G.R. Parr, P.J. Hanes and D.J. Berkery, Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.* **39** (1998), pp. 611-620.
16. P. Saravanapavan, J.R. Jones, S. Verrier, R. Beilby, V.J. Shirtliff, L.L. Hench and J.M. Polak, Binary CaO-SiO₂ gel-glasses for biomedical applications, *Biomed. Mater. Eng.* **14** (2004), pp. 467-486.
17. A. Oki, B. Parveen, S. Hossain, S. Adeniji and H. Donahue, Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials, *J. Biomed. Mater. Res. A* **69** (2004), pp. 216-221.
18. J. Brandão-Neto, V. Stefan, B.B. Mendonça, W. Bloise and A.V.B. Castro, The essential role of zinc in growth, *Nutr. Res.* **15** (1995), pp. 335-358
19. Z.-L. Tang, K. Wasserloos, C.M. St. Croix and B.R. Pitt, Role of zinc in pulmonary endothelial cell response to oxidative stress, *Am. J. Physiol. (Lung)* **281** (2001), pp. 243-249.
20. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M.C. Menziani, Synthesis, characterization, and molecular dynamics simulation of Na₂O-CaO-SiO₂-ZnO glasses, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002), pp. 9753-9760

21. L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli and U. Segre, Qualitative and quantitative structure-property relationships analysis of multicomponent potential bioglasses, *J. Phys. Chem. B* **109** (2005), pp. 4989-4998.
22. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M.C. Menziani et al, Properties of zinc releasing surfaces for clinical applications, *Journal of biomaterials applications*, volume 00- 2007.
23. G. Lusvardi¹, G. Malavasi¹, L. Menabue¹, M.C. Menziani¹, A. Pedone¹, U. Segre¹, V. Aina², A. Perardi², C. Morterra², F. Boccafoschi, S. Gatti ³, M. Bosetti³, M.Cannas³, Chemical properties of zinc releasing surfaces and related osteoblast-like cells behaviour, ¹University of Modena and Reggio Emilia, Modena, ITALY, ² Dept. of Chemistry IFM, University of Torino, ITALY, ³Dept of Clinical and Experimental Medicine, University of Eastern Piedmont, Novara, ITALY.
24. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M.C. Menziani et al, Properties of zinc releasing surfaces for clinical applications, *Journal of biomaterials applications*, volume 00- 2007.
- 25.V. [Salih, A. Patel](#), J.C. Knowles, Zinc-containing phosphate-based glasses for tissue engineering, 2007 Mar;2(1):11-20. Epub 2007 Jan 12.