



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

TESI DI LAUREA

Ipertermia: effetto del calore su mitocondri e membrana cellulare

RELATORE

Ch. mo Prof. Forzan Michele

(Dipartimento di Ingegneria Industriale)

CORRELATRICE

Dott. Ing. Sieni Elisabetta

(Dipartimento di Ingegneria Industriale)

LAUREANDA: Tronchin Arianna

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

Sommario

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introduzione | 1 |
| 1.1 | Cenni storici..... | 1 |
| 1.2 | Ipertermia per il trattamento dei tumori..... | 1 |
| 2. | Ipertermia ed oncologia..... | 3 |
| 2.1 | Temperatura: dose di calore e tipi di ipertermia | 3 |
| 2.2 | Modalità cliniche per l'induzione di ipertermia | 4 |
| 2.3 | Effetti biologici sulle cellule..... | 5 |
| 3. | Concetti base..... | 7 |
| 3.1 | Cos'è l'apoptosi | 7 |
| 3.2 | Cambiamenti citologici, morfologici e biochimici | 7 |
| 3.3 | Meccanismi d'induzione dell'apoptosi..... | 8 |
| 3.4 | I mitocondri e l'apoptosi | 10 |
| 3.5 | Il ciclo cellulare | 11 |
| 3.6 | Tecniche di analisi usate negli esperimenti..... | 13 |
| 4. | Calore e mitocondri..... | 15 |
| 4.1 | Introduzione | 15 |
| 4.2 | Ruolo dei cambiamenti mitocondriali e dell'attivazione delle caspasi nell'apoptosi indotta da calore e dai raggi-X | 15 |
| 4.3 | Dipendenza della permeabilizzazione della membrana mitocondriale dalla caspasi-2... 22 | |
| 4.4 | Localizzazione di Bcl-2 e Bax dopo l'ipertermia e il trattamento con un chemioterapico28 | |
| 4.5 | Altri esperimenti..... | 34 |
| 4.5.1. | Ruolo dei mitocondri nell'apoptosi indotta da ipertermia | 34 |
| 4.5.2. | Studio del danno mitocondriale nelle cellule CHO esposte ad ipertermia | 34 |
| 4.6 | Confronto tra gli esperimenti..... | 35 |
| 5. | Calore e blebbing | 39 |
| 5.1. | Cosa sono i blebs? | 39 |
| 5.2. | Dinamica del bleb..... | 40 |
| 5.3. | Correlazione tra il blebbing della membrana indotto dall'ipertermia e la sopravvivenza cellulare..... | 44 |
| 5.4. | Cambiamenti nella formazione dei blebs in seguito al trattamento ipertermico delle cellule CHO..... | 51 |
| 6. | Conclusioni | 53 |
| 7. | Bibliografia | 55 |

1. Introduzione

Scopo di questo elaborato è raccogliere alcuni studi presenti in letteratura scientifica riguardanti gli effetti che il calore ha sui mitocondri e la sua relazione con il blebbing, fenomeno che interessa la membrana cellulare. È noto, infatti, che i mitocondri hanno un ruolo attivo nel processo di morte cellulare programmata (apoptosi), ma, per quanto riguarda l'apoptosi indotta da ipertermia, non è ben chiara quale sia la loro funzione o che effetti subiscano. Il fenomeno del blebbing è studiato in molti ambiti della vita cellulare (apoptosi, mitosi, trasporto), ma il suo specifico rapporto con l'apoptosi indotta da ipertermia non è del tutto noto.

1.1 Cenni storici

Le proprietà terapeutiche del calore erano note fin dall'antichità: si racconta che Ippocrate (400 a.C.), padre della medicina, abbia detto "Datemi la febbre e curerò qualsiasi malattia", e fosse solito usare recipienti colmi di acqua calda da usare per la termoterapia. Tuttavia, solo verso la metà del '800 viene documentato l'effetto curativo delle temperature elevate per la cura dei tumori: il medico tedesco Bush nel 1886 osservò la scomparsa di un sarcoma della faccia di un paziente dopo degli attacchi di febbre alta. Altri casi sono stati documentati da William B. Coley (1893), chirurgo americano che trattò alcuni pazienti oncologici con una tossina estratta dai batteri che provocava una reazione febbrile tale da attivare le difese immunitarie, con conseguente remissione del tumore nel 45-50% dei casi. Nel 1898 Westermarck, ginecologo svedese, usò una spirale metallica dentro cui scorreva acqua calda per trattare un tumore uterino. La pubblicazione della tesi di suo figlio Nils, "Effetti del calore sui tumori del ratto" (1927) suscitò l'interesse di Kristian Overgaard (1899-1976) che in Danimarca compì numerosi studi in questo campo, ora portati avanti dal figlio Jeans Overgaard. [2]

1.2 Ipertermia per il trattamento dei tumori

L'ipertermia è utilizzata per il riscaldamento dei tessuti biologici a temperature superiori a quella fisiologica (37°C), in un range compreso tra i 41°C e i 46°C. Attualmente in oncologia questa tecnica non viene utilizzata come alternativa ai trattamenti tradizionali, ma in combinazione con altri trattamenti antitumorali quali radioterapia e chemioterapia per aumentarne la loro efficacia, senza aumentarne gli effetti collaterali. L'organo interessato viene riscaldato per circa un'ora ad una temperatura di circa 43°C e, per evitare l'induzione della termotolleranza, il trattamento non viene eseguito più di 3 volte in una settimana [1]. Si ipotizza che l'ipertermia possa avere un effetto sul trattamento dei tumori perché nei tessuti tumorali si ha un'angiogenesi caotica per cui l'effetto di dissipazione del calore mediante il flusso sanguigno non è sufficiente. Questo fenomeno di scarsa efficienza della dissipazione del calore comporta la presenza di zone con un

pH molto acido, prive di nutrienti e di ossigeno, condizione per cui le cellule sono maggiormente sensibili all'effetto citotossico del calore. Tuttavia, ad oggi non è ancora completamente chiaro il legame tra citotossicità ed esposizione al calore; è noto però che tramite l'ipertermia nel range di temperature 41°C-46°C, le cellule possono essere portate a morte per via apoptotica, alterando le tre principali strutture cellulari:

- nucleo:
 - rarefazione della cromatina;
 - riduzione proteine endonucleari;
 - inibizione della duplicazione del DNA.
- membrana plasmatica
- citoscheletro:
 - fluidità;
 - trasporto transmembrana;
 - potenziale di membrana;
 - formazione di bleb;
 - disturbi alla respirazione cellulare.

2. Ipertermia ed oncologia

2.1 Temperatura: dose di calore e tipi di ipertermia

Nell'ipertermia le grandezze fondamentali per valutare la sopravvivenza cellulare sono la temperatura e la durata dell'esposizione al calore. La relazione tra questi parametri e la sopravvivenza delle cellule non è lineare (figura 1), e ciò che si può notare è una diminuzione di quest'ultima all'aumentare della temperatura e del tempo di esposizione.

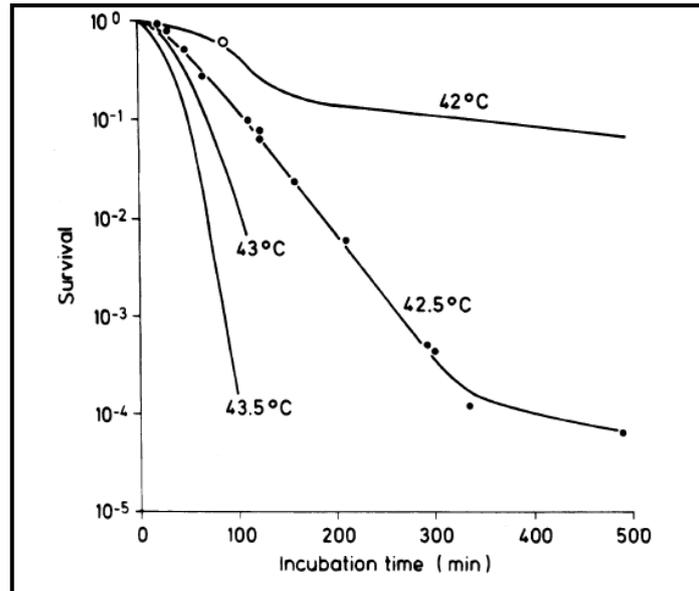


Figura 1: curve che mostrano la relazione tra dose di calore e l'effetto sulle cellule. [2]

Inoltre, in base alla temperatura usata nel trattamento oncologico si possono distinguere tre differenti tipi di ipertermia:

- **Termo ablazione a temperature superiori ai 50°C**, con applicazione diretta sul tumore e morte cellulare dopo un breve periodo di tempo;
- **Ipertermia classica a 41-45°C**, preserva i tessuti adiacenti alla zona trattata ma richiede un tempo più lungo rispetto alla termo ablazione;

Mild ipertermia a 40-43°C, per aumentare l'efficacia degli altri trattamenti come chemioterapia e radioterapia.

2.2 Modalità cliniche per l'induzione di ipertermia

Le principali tecniche con cui viene indotta l'ipertermia nella cura oncologica sono le seguenti:

- **Ipertermia total body:** trattamento sperimentale a temperature limitate a 41-42°C, utilizzato per la cura del cancro metastatico [3, 6];
- **Ipertermia regionale:** trattamento usato per trattare ampie aree del corpo come cavità corporee e arti [3];
- **Ipertermia locale:** il calore viene applicato in una piccola zona tumorale o all'interno del tumore stesso [3]. Vengono usati diversi tipi di energia:
 - *Ultrasuoni con frequenze tra 0.3 e 3 MHz;*
 - *Radiazioni elettromagnetiche a frequenza inferiore a 300 MHz ;*
 - *Radiazioni elettromagnetiche a frequenza tra 300 e 2450 MHz.*

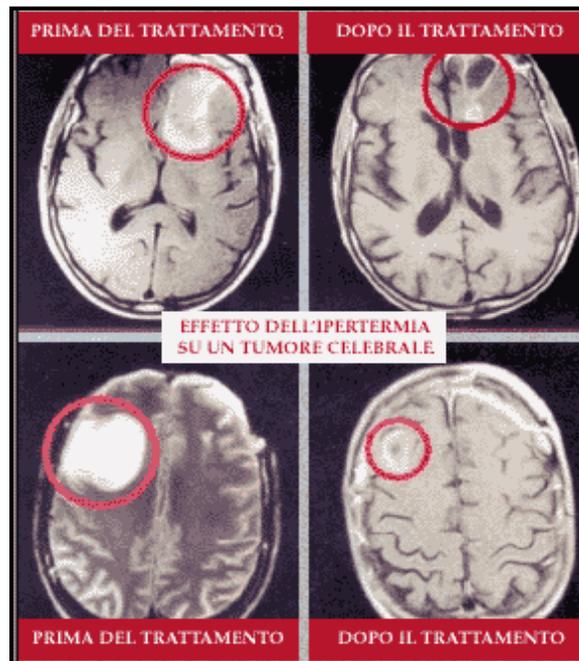


Figura 2: Effetto dell'ipertermia su due tumori cerebrali. [1]

2.3 Effetti biologici sulle cellule

È noto che il calore causa delle alterazioni alle principali strutture citoplasmatiche, anche se non è ancora chiaro il legame tra l'esposizione a temperature di 42-43°C e la citotossicità. [2, 4]

- Nucleo
 - Rarefazione della cromatina;
 - Modificazioni del nucleolo;
 - Alterazione quantitativa delle proteine endonucleari;
 - Inibizione della duplicazione del DNA e dei suoi enzimi riparatori.
- Membrana plasmatica
 - Cambiamenti nel trasporto attivo delle proteine;
 - Perdite ematiche;
 - Aumento del contenuto in colesterolo;
 - Variazione della permeabilità della membrana;
 - Blebbing.
- Citoscheletro e citoplasma
 - Disturbi nella respirazione cellulare e nella glicolisi;
 - Ipertrofia dell'apparato di Golgi;
 - Aumento in volume e numero dei lisosomi.

3. Concetti base

3.1 Cos'è l'apoptosi

L'apoptosi è una forma di morte "naturale" delle cellule che può essere indotta da fenomeni di stress che provocano delle reazioni metaboliche tali da indurre le cellule a "suicidarsi". Questo processo è attivo, quindi con consumo di energia (ATP) e con trascrizioni e sintesi proteiche. È ben diverso dalla necrosi, processo per cui si ha morte cellulare per cause traumatiche o di stress acuto. Le cellule necrotiche esplodono e riversano il loro contenuto sulle cellule vicine, causando una risposta infiammatoria potenzialmente dannosa per l'organismo. L'apoptosi provoca la morte delle cellule che vengono "riassorbite" dell'organismo senza attivare la risposta infiammatoria.

Le fasi in cui è possibile suddividere il processo apoptotico sono 4 [5]:

1. **Fase di induzione dell'apoptosi:** interazione tra i segnali di morte cellulare e le proteine pro e anti apoptotiche;
2. **Fase di esecuzione:** attivazione della cascata delle caspasi e distruzione della struttura cellulare mediata dalle caspasi;
3. **Riconoscimento e fagocitosi del corpo cellulare:** la cellula espone sulla membrana plasmatica segnali "eat me"¹, come la fosfatidilserina, per i macrofagi;
4. **Degradazione del corpo cellulare da parte della cellula fagocitica.**

3.2 Cambiamenti citologici, morfologici e biochimici

Nel processo apoptotico si assiste a [2, 4, 5]:

- Collasso del citoscheletro con conseguente perdita di volume;
- Condensazione della cromatina;
- Formazione di vescicole citoplasmatiche che contengono organuli condensati e pezzi di nucleo (blebs). Andranno a formare i corpi apoptotici, successivamente fagocitati;
- Frammentazione del DNA.

Aspetti morfologici e biochimici che si presentano:

- **Modifica delle dimensioni cellulari:** contrazione cellulare causata dalla condensazione citoplasmatica;
- **Modifica della membrana plasmatica:** durante l'apoptosi la fosfatidilserina (PS) passa nella parte extracellulare della membrana plasmatica;

¹ Dall'inglese "mangiarmi"

- **Modifiche citoplasmatiche:** i mitocondri rilasciano il citocromo-c che provoca l'attivazione delle caspasi, proteine che controllano il processo apoptotico;
- **Modifiche nucleari:** frammentazione del DNA.

Si parla di *early apoptotic cells* riferendosi a cellule che si trovano nelle prime fasi del processo apoptotico, quando ancora conservano l'integrità della membrana cellulare, mentre si parla di *late apoptotic cells* per riferirsi a cellule che si trovano in una fase avanzata del processo apoptotico, quando la membrana cellulare viene compromessa [7].

3.3 Meccanismi d'induzione dell'apoptosi

L'attivazione e la regolazione del processo apoptotico possono essere provocate sia da segnali interni alla cellula (via intrinseca), che richiedono il coinvolgimento di proteine, sia da segnali esterni (via estrinseca) che attivano la trasduzione del segnale che porta alla morte cellulare per apoptosi. [1, 8]

3.3.1 Via estrinseca mediata da recettori di morte

La via estrinseca ha inizio con segnali esterni alla cellula, quali il TNF², fattore di necrosi tumorale, gruppo di proteine prodotte dal sistema immunitario, il ligando di Fas³ (Fas-L), che è una proteina che appartiene sempre alla famiglia del TNF ed è presente sui linfociti T attivati, e specifici ormoni. Questi segnali esterni interagiscono con i recettori proteici (Fas, recettori degli ormoni, TNF) che si possono trovare nel citosol o sulla membrana della cellula da eliminare, e presentano una modifica della conformazione della proteina detta "dominio di morte". La combinazione tra questa modifica e il segnale di morte porta alla formazione di un complesso multiproteico con altre proteine, TRADD⁴, RIP⁵ e FADD⁶ che, legandosi alla caspasi 8, portano all'attivazione a cascata delle altre caspasi e all'induzione dell'apoptosi. Le caspasi sono un gruppo di proteasi intracellulari contenenti un residuo di cisteina nel sito attivo che inducono il processo di apoptosi; di per sé sono inattive e, quando necessario, vengono attivate da un meccanismo a cascata.

² **Fattore di necrosi tumorale** (TNF), gruppo di citochine (TNF- α , TNF- β) che mediano la risposta infiammatoria.

³ **Fas**, proteina recettore transmembrana della famiglia dei TNF.

⁴ **TRADD**, Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein.

⁵ **RIP**, Ribosome Inactivating Proteins, proteina chinasi che attiva il processo apoptotico.

⁶ **FADD**, FAS Associated protein with Death Domain.

Una volta attivata la caspasi 8 si ha la seguente cascata di eventi:

- Attivazione della caspasi 3;
- Caspasi 3 entra nel nucleo e taglia la proteina ICAD⁷;
- Rilascio di DNasi che inizia a degradare il DNA
- Morte cellulare

3.3.2 Via intrinseca mediata da mitocondri

Questa via di induzione dell'apoptosi avviene sotto il controllo del mitocondrio ed è innescata in risposta ad anomalie intracellulari. L'evento chiave di questo processo è il rilascio di citocromo c dal mitocondrio al citosol che, una volta fuoriuscito, forma con altre proteine e la caspasi 9 un complesso chiamato apoptosoma. La fuoriuscita può essere favorita dalla proteina Bid, una volta che viene attivata dalla caspasi 8 (caspasi 8 comune a via estrinseca ed intrinseca).

Nel processo sono coinvolte le proteine della famiglia Bcl-2, le proteine di inibizione dell'apoptosi (IAP), e il secondo attivatore mitocondriale di caspasi (SMAC).

Le proteine Bcl-2 si dividono in:

- **Proapoptotiche:** favoriscono l'apoptosi; sono BH123 (Bax e Bak) e BH3;
- **Antiapoptotiche:** inibiscono l'apoptosi; tra queste c'è la stessa Bcl-2.

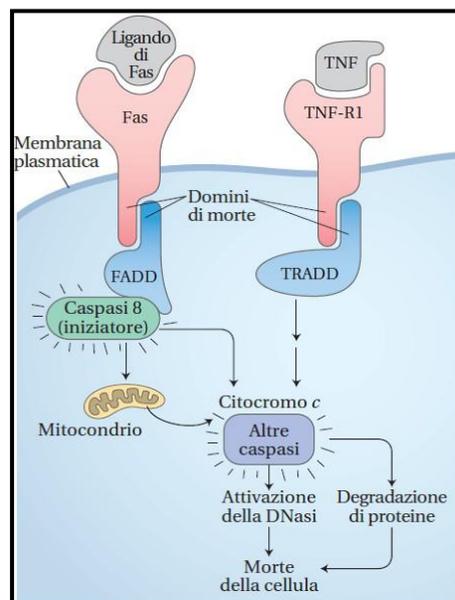


Figura 3: le due vie dell'apoptosi: via estrinseca e via intrinseca [8].

⁷ ICAD, Inhibitor of Cad (Caspase-Activated Dnase)

3.4 I mitocondri e l'apoptosi

I mitocondri sono organelli di forma ovoidale, lunghi circa 2 μm e con un diametro di circa 0.5 μm . Contengono le strutture respiratorie della cellula, gli enzimi del ciclo dell'acido citrico e dell'ossidazione degli acidi grassi. Questi organelli possiedono due sistemi di membrane: una esterna e una interna molto estesa e ripiegata a formare delle pieghe chiamate creste. Nel mitocondrio esistono due compartimenti: lo spazio intermembrana, tra la membrana esterna e interna, e la matrice, lo spazio delimitato dalla membrana interna. La membrana esterna è permeabile alla maggior parte delle molecole piccole e agli ioni; al contrario, considerando uno spostamento dall'esterno all'interno, la membrana interna è impermeabile alle molecole polari e a quasi tutti gli ioni. A causa del passaggio di ioni H^+ dalla matrice del mitocondrio allo spazio intermembrana (interno \rightarrow esterno), si genera un potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi$ tale per cui la membrana interna sarà carica positivamente all'esterno, e negativamente all'interno.

Il mitocondrio funziona da centrale d'integrazione degli stimoli apoptotici. Essi possono essere di molteplice natura e sono in grado di determinare l'apertura di un complesso poliproteico chiamato "poro di transizione mitocondriale" (Permeability Transition Pore Complex, PTPC) localizzato in alcuni punti di contatto tra le due membrane mitocondriali, controllato da proteine della famiglia Bcl-2: le proteine antipapototiche mantengono il canale chiuso, mentre quelle proapoptitiche lo aprono. Fattori esterni possono alterare la permeabilità mitocondriale agendo sul canale (o su altre strutture della membrana mitocondriale) causando il riempimento di liquido del mitocondrio, lo scoppio della membrana esterna e la fuoriuscita di fattori stimolanti l'apoptosi come AIF (Apoptosis Inducing Factor), che è in grado di raggiungere il nucleo ed attivare una via in grado di degradare il DNA, ed il citocromo c che si lega alle proteine Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) e caspasi 9 ed una molecola di ATP [9].

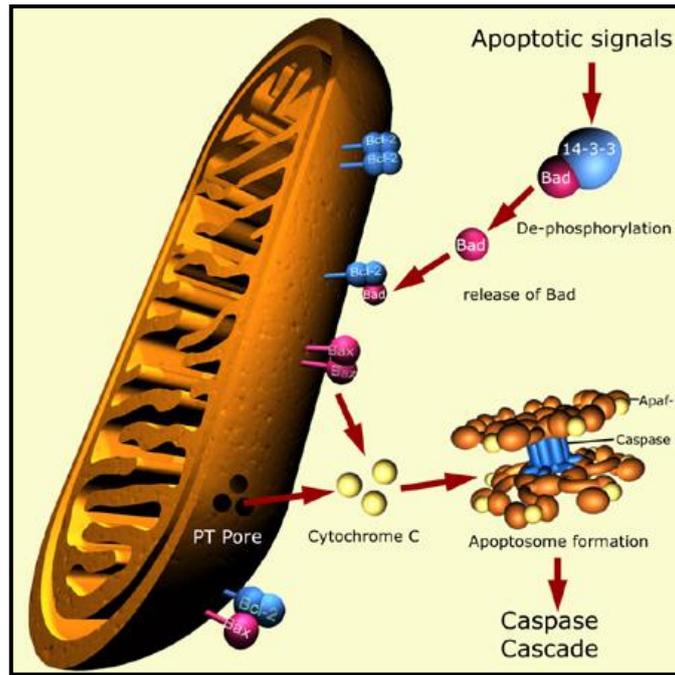


Figura 4: formazione dei pori sulla membrana mitocondriale in seguito al rilascio di Bad, con conseguente fuoriuscita di Citocromo C. [10]

3.5 Il ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è l'insieme delle fasi che nella cellula si succedono per portarla a dividersi in due cellule geneticamente identiche (mitosi). Questo ciclo viene suddiviso in due serie di fasi: mitosi (fase M) e interfase, a sua volta formata dalle fasi G1, S e G2 (G = gap, S = sintesi).

- **Fase G1:** più lunga e variabile; durante questa fase vengono sintetizzate le proteine, i carboidrati e i lipidi;
- **Fase S:** fase di sintesi del DNA e di duplicazione dei cromosomi;
- **Fase G2:** fase breve caratterizzata da un significativo aumento di volume e dalla sintesi di un gruppo di proteine necessarie per la mitosi.
- **Fase M:** processo di divisione.

Alcune cellule possono entrare in una fase di inattività produttiva (fase G0), per tornare in G1 dopo opportuni stimoli.

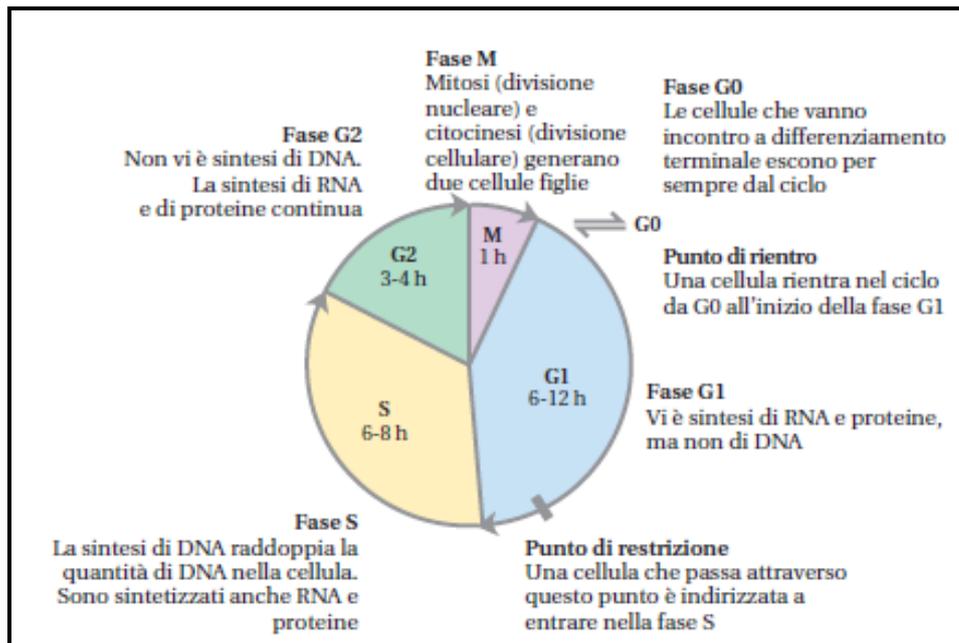


Figura 5 : fasi del ciclo cellulare di una cellula eucariote.[8]

Nel ciclo si susseguono anche una serie di “checkpoint”, cioè punti di controllo, con lo scopo di controllare che la fase precedente sia completata correttamente, prima di iniziare la successiva. I punti di controllo sono:

- **G1 checkpoint:** vengono controllate le dimensioni della cellula e l’ambiente circostante (favorevole o meno);
- **G1/S checkpoint:** viene verificata l’assenza di danni genetici;
- **G2 checkpoint:** vengono controllate le dimensioni, la completezza della duplicazione e l’integrità del materiale genetico, con eventuale riparazione del DNA;
- **M checkpoint:** viene controllata la corretta segregazione dei cromosomi.

Se i segnali che regolano il ciclo e le sue fasi non vengono correttamente interpretati dalla cellula, questa può diventare maligna. [8, 9, 12]

3.6 Tecniche di analisi usate negli esperimenti

Nella maggior parte degli esperimenti riportati in seguito viene usata una tecnica di analisi chiamata “**citometria a flusso**”, ossia un metodo di conteggio di cellule (marcate con un colorante specifico) contenute in un liquido organico, ottenuto tramite apparecchiature elettroniche. Con questa tecnica è possibile evidenziare i caratteri fisici di una cellula, come volume e dimensioni, e descrivere alcuni aspetti chimici. Alla base di questa tecnica ci sono due fenomeni fisici:

- **diffusione** a piccolo ($1^\circ \pm 0.1^\circ$) e grande ($90 \pm 12.5^\circ$) angolo per selezionare popolazioni cellulari;
- **fluorescenza**, per identificare le popolazioni cellulari e riconoscere le sostanze cellulari. [11, 12]

I metodi di studio dell'apoptosi con questa tecnica sono:

- Analisi della distribuzione del DNA durante la fase G1 con colorazione con **Ioduro di Propidio (PI)**;
- Rivelazione della rilocalizzazione della fosfatidilserina (PS) tramite **Annexin V** coniugata al residuo fluorescente **FITC** (fluoresceina isotiocianato);
- Valutazione della frammentazione del DNA, con metodo **TUNEL**⁸. [5]

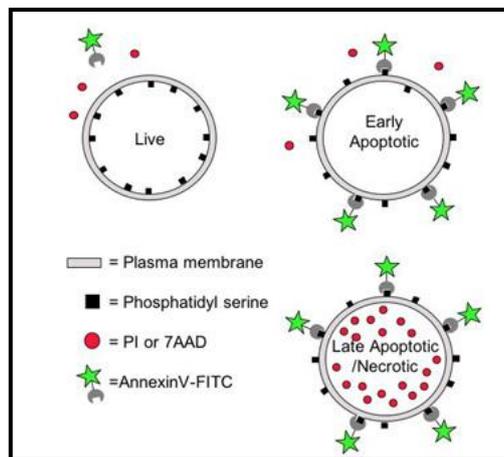


Figura 6: L'Annexina V con il residuo fluorescente FITC si lega alla PS che fuoriesce dalla membrana cellulare all'inizio dell'apoptosi. [11]

In alcuni esperimenti è stato usato il **colorante fluorescente lipofilo JC-1**, utile per lo studio del ruolo che il mitocondrio ha nel processo apoptotico data la sua capacità di distinguere i

⁸ TUNEL, TdT mediato dUTP nick end labelling

mitocondri con alto e basso potenziale di membrana. Nei mitocondri con un alto potenziale di membrana, JC-1 si presenta in aggregati che emettono lunghezze d'onda arancio/rosso, mentre in quelli con basso potenziale di membrana si presenta come monomero che emette nel range del verde.

Il **FLICA** (Fluorocromo Inibitore delle Caspasi) è un reagente non tossico a cui le cellule sono permeabili, che permette di individuare le caspasi attive. Il reagente FLICA che non si lega alle cellule viene eliminato con un lavaggio. Il segnale di fluorescenza che ne deriva è una misura diretta del numero di caspasi attive presenti. Sempre per quanto riguarda le caspasi viene usato anche un inibitore delle caspasi attive, **VAD-fmk**: la membrana cellulare è permeabile a questo composto che viene assorbito direttamente; una volta all'interno della cellula lega tutte le caspasi attivate. In particolare, per inibire la caspasi-2, viene usato **zVDVAD-fmk**.

Il **Western blot** (o immunofissazione) è una tecnica che permette di identificare e quantificare precise proteine in una miscela di proteine, usando specifici anticorpi. [12]

4. Calore e mitocondri

4.1 Introduzione

Vengono qui raccolti i risultati di alcuni esperimenti effettuati applicando l'ipertermia a differenti linee cellulari, al fine di valutare l'effetto che il calore ha sui mitocondri e sulle particelle cellulari ad essi legate.

4.2 Ruolo dei cambiamenti mitocondriali e dell'attivazione delle caspasi nell'apoptosi indotta da calore e dai raggi-X

In questo esperimento sono stati usati due differenti metodi per indurre l'apoptosi, calore e raggi-X; di seguito si riportano principalmente i dati relativi agli effetti del calore, facendo qualche cenno a quelli relativi all'irradiazione con raggi-X. [13.a]

4.2.1 Materiali e metodi

COLTURA CELLULARE: linea leucemica umana che vive in sospensione (HL60);

TRATTAMENTO DI INDUZIONE DELL'APOPTOSI: l'apoptosi è stata indotta dal calore usando un bagno di acqua distillata mantenendo le cellule in sospensione a 43°C per un'ora. La temperatura è stata monitorata in tutti gli esperimenti per garantire una temperatura di $43 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Per gli esperimenti in cui si usa irradiazione, le cellule sono state esposte a raggi-X a 6MeV a frazioni di 5Gy/min, per un totale di 8Gy. Per inibire l'apoptosi è stato usato l'inibitore delle caspasi zVAD-fmk, mentre una specifica caspasi-2 inibitrice (zVDVAD-fmk) è stata usata un'ora prima degli esperimenti.

POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE: Per identificare la caduta del potenziale di membrana mitocondriale le cellule sono state incubate con la sonda fluorescente JC-1 per 20 minuti a 27°C. È stata aggiunta Ciclosporina-A per ostacolare ulteriori cambiamenti del potenziale di membrana e per stabilizzarla. La colorazione delle cellule è stata quantificata con la citometria a flusso.

ATTIVAZIONE DELLE CASPASI: per rilevare le caspasi attivate è stato usato il metodo FLICA (Fluorochrome Inhibitor of Caspases).

QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI BCL-2 E BAX: Con la citometria a flusso, dopo 1 ora e 2 ore, è stato determinato il livello intracellulare delle proteine Bax e Bcl-2.

4.2.2 Risultati

RISULTATI SPERIMENTALI DELLO STUDIO DELLA CINETICA DEL POTENZIALE DI MEMBRANA, DELL'ATTIVAZIONE DELLE CASPASI, DELL'ESPOSIZIONE DELLA FOSFATIDILSERINA E DELLA REGOLAZIONE DI BCL-2 E BAX: Nel primo set di esperimenti le cellule sono state riscaldate a 43°C per un'ora e sono state individuati gli effetti caratteristici dell'apoptosi nelle cellule. L'induzione dell'apoptosi è stata associata ad una diminuzione di $\Delta\Psi$ (potenziale di membrana mitocondriale) come dimostrato dalla colorazione di JC-1⁹. (figura 7.a)

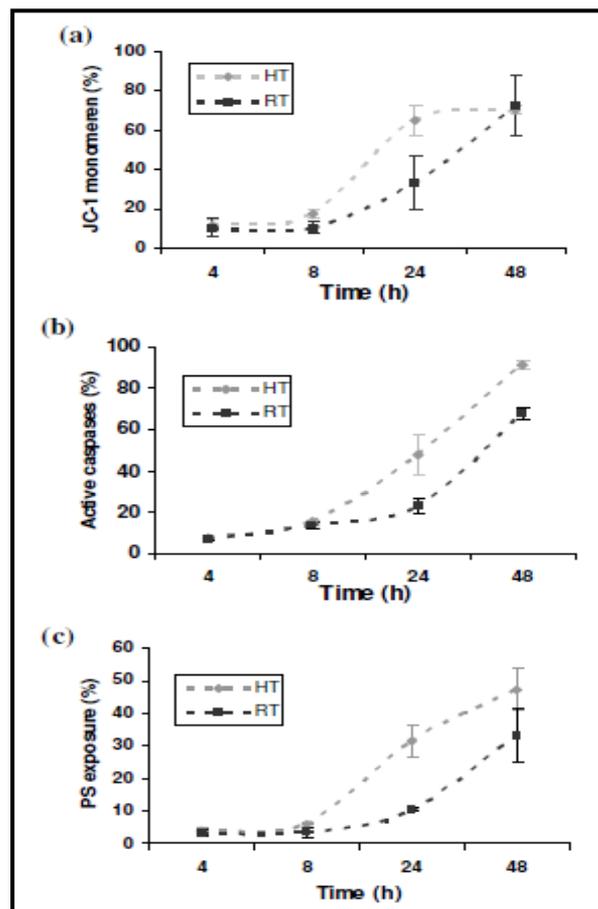


Figura 7: Nel grafico viene mostrata la percentuale di cellule, su un totale di 10.000, che presentano fluorescenza dopo i trattamenti con ipertermia (HT) e raggi-X (RT); è stato usato JC-1 per valutare la depolarizzazione della membrana mitocondriale (a), FLICA per evidenziare le caspasi attivate (b) e Annexina V con FITC per valutare le cellule che presentano la fosfatidilserina sulla membrana esterna. [13.a]

⁹ Colorante fluorescente lipofilico

Le cellule normali e vitali possiedono un alto potenziale di membrana mitocondriale. Tuttavia, in condizioni apoptotiche il potenziale della membrana mitocondriale interna diminuisce, causando un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna. La depolarizzazione della membrana mitocondriale si presenta dopo 8 ore e raggiunge un massimo dopo 24 ore, quando il 70% delle cellule mostra una variazione di $\Delta\Psi$.

Come mostrato in figura 7.b e 7.c, sono state trovate caspasi attivate 8 ore dopo l'esposizione al calore e, sempre dopo 8 ore, si ha l'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS): confrontando i risultati ottenuti nella figura 7, si può quindi notare uno stretto legame tra l'attivazione delle caspasi, la variazione di $\Delta\Psi$ e l'esternalizzazione di PS.

Tabella 1: fattori modificati durante l'esperimento

| Fattore modificato | Colorazione usata | Primi cambiamenti rilevati | Massimo |
|---|--------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Potenziale di membrana mitocondriale | JC-1 | Dopo 8 ore | Dopo 24 ore |
| Attivazione delle caspasi | FLICA | Dopo 8 ore | Dopo 48 ore |
| Esposizione della fosfatidilserina | Annexina V con FITC | Dopo 8 ore | Dopo 48 ore |

Poiché i mitocondri sono i principali obiettivi della famiglia di proteine Bcl-2, il livello di manifestazione di Bcl-2 (antiapoptotica) e di Bax (proapoptotica) è stato direttamente monitorato dopo il trattamento termico. Un'ora dopo il trattamento i livelli di Bcl-2 cominciano a calare, continuando a diminuire per altre 2 ore. La proteina Bax mostra un significativo assestamento verso l'alto del suo livello, circa al 250% del suo livello iniziale.

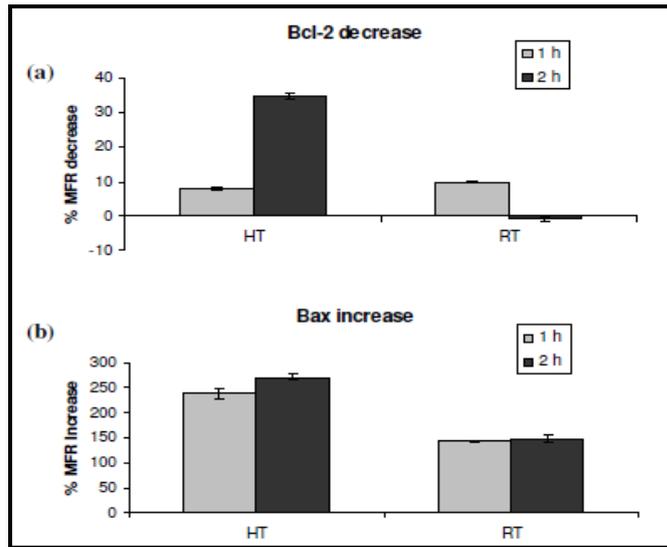


Figura 8: livelli intracellulari delle proteine Bcl-2 e Bax. Percentuale di diminuzione dei livelli di Bcl-2 (a), e percentuale di aumento di Bax (b) dopo 1 e 2 ore dal trattamento con ipertermia (HT) e con i raggi-X (RT). [13.a]

ANALISI DEL TASSO APOPTOTICO: a causa della disintegrazione delle cellule nel tempo, lo studio del tasso apoptotico è risultato difficoltoso. L'esposizione delle cellule al reagente FLICA blocca l'attivazione delle caspasi e arresta ulteriori progressi nella cascata apoptotica, prevenendo la disintegrazione cellulare. La marcatura con fluorescenza delle cellule che entrano in apoptosi e delle cellule morte con Ioduro di Propidio (PI) offre la possibilità di misurare la quantità di cellule apoptotiche nel tempo.

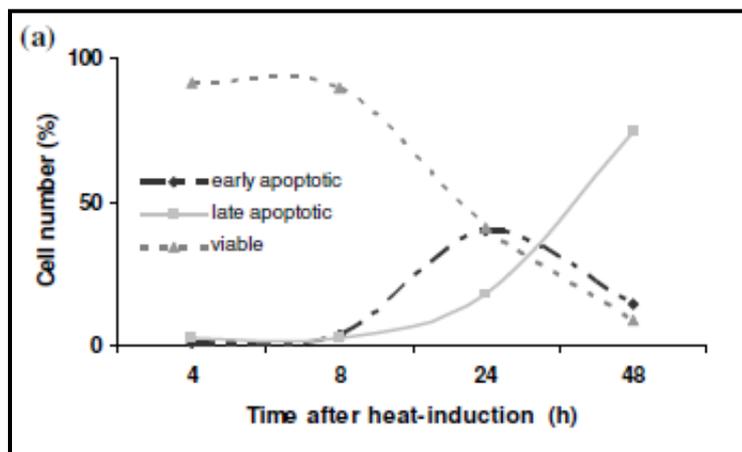


Figura 9: tasso di cellule in apoptosi dopo il trattamento con il calore (43°C per 1 ora). Viene riportata la percentuale nel tempo di cellule vitali, di "early apoptotic cells" e di "late apoptotic cells", su un totale di 10.000 cellule, che mostrano fluorescenza. [13.a]

INFLUENZA DELL'INIBIZIONE DELLE CASPASI SU $\Delta\Psi$ E SULL'ESTERNALIZZAZIONE DELLA FOSFATIDILSERINA:

Per individuare il ruolo che le caspasi hanno nella transizione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi$ e nell'esposizione della fosfatidilserina (PS), è stato testato l'effetto della caspasi inibitrice zVAD-fmk sulle cellule HL60. Come si vede in figura 10.a, è stato osservato che la perturbazione della membrana mitocondriale e conseguentemente il cambiamento del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi$ non richiede l'attivazione delle caspasi, dal momento che zVAD-fmk non è in grado di arrestare il cambiamento del potenziale di membrana mitocondriale (MMP). I risultati mostrati in figura 10.b indicano che l'inibizione della caspasi-2 previene la caduta di MMP dopo il trattamento termico. Anche se l'inibizione della caspasi non ha bloccato gli eventi mitocondriali indotti dall'ipertermia, zVAD-fmk ha ridotto significativamente i cambiamenti mitocondriali, come ad esempio l'esternalizzazione della fosfatidilserina (dal 47% al 10%) e la disintegrazione cellulare.

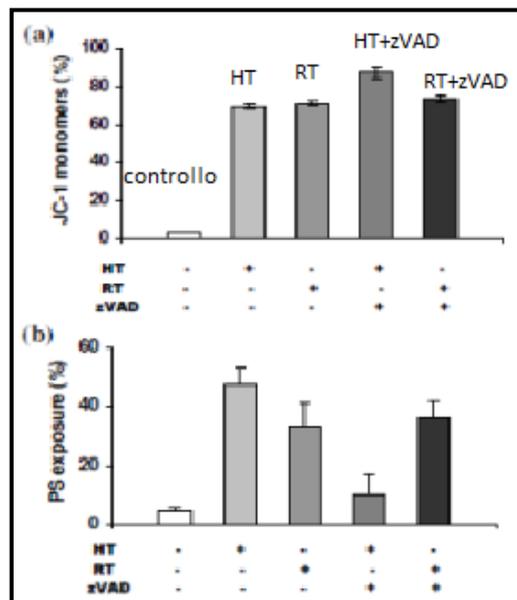


Figura 10: effetto dell'inibitore zVAD-fmk sulla perturbazione di $\Delta\Psi$ e sull'esposizione della PS. La 1^a colonna indica il campione di confronto (HT-, RT-, zVAD-), la 2^a i risultati ottenuti solo con il calore (HT+, RT-, zVAD-), la 3^a solo con le radiazioni (HT-, RT+, zVAD-), la 4^a con la combinazione di calore e zVAD (HT+, RT-, zVAD+) e l'ultima con la combinazione di radiazioni e zVAD (HT-, RT+, zVAD+). Viene riportata la percentuale di cellule che presentano fluorescenza, su un totale di 10.000. (a) Percentuale di cellule con il monomero JC-1 dopo 24 ore, in stretta correlazione con la depolarizzazione del potenziale della membrana mitocondriale. (b) Percentuale delle cellule che mostrano un'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS) dopo 48 ore dall'induzione dell'apoptosi.

[13.a]

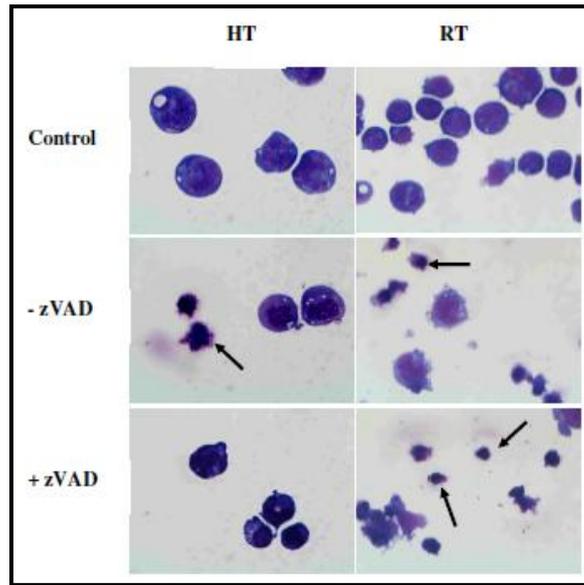


Figura 11: effetti del calore (HT, 43°C per 1 ora) e dei raggi-X (RT) sulle cellule HL60 in presenza o assenza di zVAD-fmk. Le immagini sono state prese con un microscopio ottico e rappresentano esperimenti indipendenti. Le frecce indicano le cellule in apoptosi e i corpi apoptotici. [13.a]

4.2.3 Discussione

Questo studio mostra che la “mild ipertermia” (cellule mantenute a 43°C per 1 ora) delle cellule HL60 induce l’apoptosi inattivando alcune funzioni mitocondriali, con conseguente aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna. I cambiamenti cellulari, che iniziano con la perturbazione del potenziale della membrana mitocondriale $\Delta\Psi$, si evidenziano dopo 8 ore dal trattamento con il calore. L’aumento delle *late apoptotic cells* (figura 9), dopo 8 ore dal trattamento, indicano una permeabilizzazione della membrana esterna che non era attesa in presenza dell’inibitore delle caspasi FLICA. Una possibile spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere che, nonostante il processo di apoptosi sia stato bloccato allo stadio di attivazione delle caspasi, le caspasi mediano l’induzione di eventi che potrebbero verificarsi con un certo ritardo temporale.

L’analisi della cascata dei cambiamenti mitocondriali indica che l’ipertermia induce l’apoptosi caratterizzata dall’attivazione delle caspasi, come l’esternalizzazione della fosfatidilserina, e dalla formazione di corpi apoptotici. Dopo la permeabilizzazione della membrana mitocondriale molte proteine intermembrana solubili (incluso il citocromo c) vengono rilasciate nel citosol, dove attivano le caspasi legandosi ad Apaf-1. Il blocco dell’attivazione delle caspasi da parte di zVAD-fmk non influenza la diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale. Dopo l’induzione dell’apoptosi, il livello di Bcl-2 diminuisce mentre quello di Bax aumenta direttamente; ciò

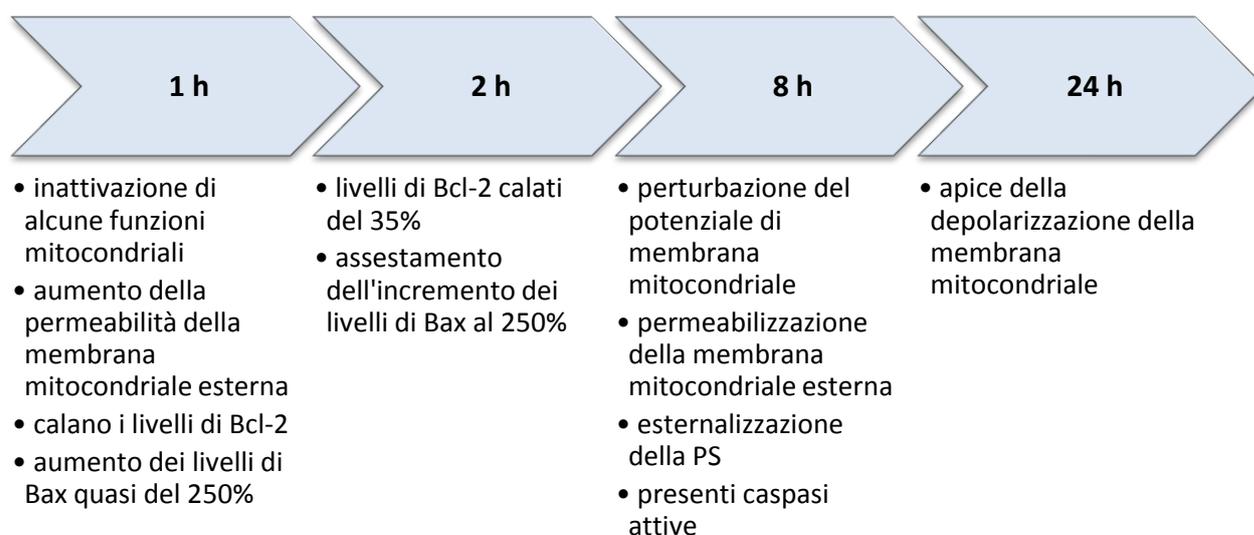
suggerisce il coinvolgimento dei componenti della famiglia delle Bcl-2 nella permeabilizzazione della membrana mitocondriale. L'esame degli eventi a valle dei cambiamenti mitocondriali indica che l'ipertermia induce l'apoptosi caratterizzata dall'attivazione delle caspasi, come ad esempio l'esposizione della fosfatidilserina e la formazione di corpi apoptotici.

Quindi, la ricorrenza nel tempo delle varie fasi apoptotiche evidenziate da questo studio sono in accordo con la generale concezione che coinvolge il percorso apoptotico intracellulare.

Tabella 2: fattori che influenzano o meno la membrana mitocondriale

| Fattori che influenzano la membrana mitocondriale | Fattori che NON influenzano la membrana mitocondriale |
|---|---|
| Famiglia di proteine Bcl-2 | Blocco dell'attivazione delle caspasi con zVAD-fmk |

Tabella 3: eventi dopo 1h, 2h, 8h e 24h dal trattamento con ipertermia



4.3 Dipendenza della permeabilizzazione della membrana mitocondriale dalla caspasi-2

L'apoptosi indotta dal calore procede per via mitocondriale attraverso la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna (MOMP: **Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization**) con conseguente rilascio di citocromo c. Questa risposta al calore è mediata dalla famiglia di proteine Bcl-2, come ad esempio Bax, la cui regolazione è mediata anche dalla caspasi-2. In questo studio è stato analizzato l'inizio del processo apoptotico indotto dal calore e dai raggi-X (a cui verrà fatto solo qualche cenno), ponendo particolare attenzione ai membri delle proteine Bcl-2 e al rilascio di citocromo c, con e senza l'inibizione della caspasi-2. [13.b]

4.3.1 Materiali e metodi

COLTURA CELLULARE: linee cellulari emopoietiche HSB-2 (cellule leucemiche linfoblastiche acute), HL60 (cellule leucemiche promielocitiche umane) e Kasumi-1 (cellule umane mieloide leucemiche).

TRATTAMENTO DI INDUZIONE DELL'APOPTOSI: Apoptosi indotta dal calore usando un bagno di acqua distillata a 43°C in cui sono state posti i contenitori con le cellule in sospensione per un'ora. Per gli esperimenti in cui si usa irradiazione, le cellule sono state esposte a raggi-X a 6MeV a frazioni di 5Gy/min, per un totale di 8Gy. Per inibire la caspasi 2 è stato usato l'inibitore specifico zVDVAD-fmk un'ora prima degli esperimenti.

QUANTIFICAZIONE DEI LIVELLI DI BCL-2 E BAX: Con citometria a flusso, dopo 1 ora e 2 ore è stato determinato il livello intracellulare delle proteine Bax e Bcl-2.

MONITORAGGIO DEL RILASCIO DI CITOCROMO C: il rilascio di citocromo c dai mitocondri al citosol è stato monitorato con la citometria a flusso.

LOCALIZZAZIONE DI BCL-2 E BAX: la localizzazione intracellulare delle proteine Bcl-2 e Bax è stata indagata con microscopia confocale dopo 2 ore dall'induzione all'apoptosi.

4.3.2 Risultati

ESPRESSIONE DI BCL-2 E BAX DOPO IL TRATTAMENTO TERMICO: per valutare il ruolo di Bcl-2 e Bax nella regolazione della permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna ne è stato monitorato il loro livello. Le linee cellulari emopoietiche HL60, HSB2 e Kasumi-1 sono state esposte al calore e sono stati preparati dei campioni dopo due ore dal trattamento. Il calore induce cambiamenti quantitativi nell'espressione della proteina Bax rispetto al confronto con le cellule di controllo.

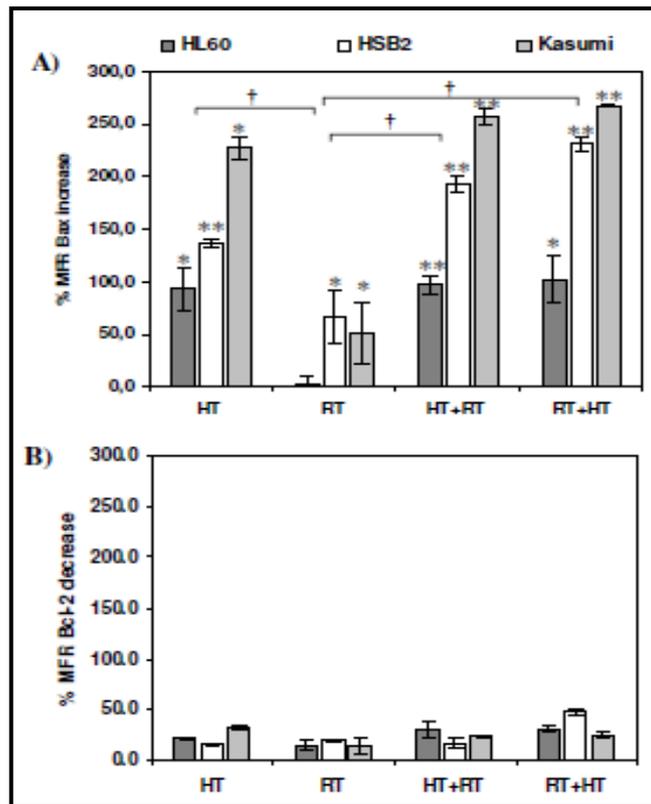


Figura 12: livelli intracellulari delle proteine Bcl-2 e Bax. (A) percentuale di aumento di Bax nelle cellule HL60, HSB2 e Kasumi-1 dopo due ore dal trattamento con calore (HT), raggi-X (RT), calore immediatamente seguito da raggi-X (HT+RT) e viceversa (RT+HT). MFR è il rapporto tra l'intensità della fluorescenza media (MFI: Mean Fluorescent Intensity) degli anticorpi primari (che riconoscono e legano la proteina di interesse) e della MFI delle cellule di controllo.[13.b]

L'incremento dell'espressione di Bax dipende dal tipo di cellula: si trova un aumento del 93% per HL60 e del 228% per Kasumi-1. Inoltre, dagli istogrammi riportati in figura 12 si può notare che la combinazione dei trattamenti (es. ipertermia e raggi-X) porta ad un aumento dell'espressione di Bax, indipendentemente dall'ordine con cui vengono applicati calore e raggi-X. Tuttavia, questa osservazione non può essere fatta per la proteina Bcl-2: i suoi livelli rimangono pressoché invariati (calo di circa il 30% in media) con qualsiasi trattamento e indipendentemente dalla linea cellulare usata.

LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI BCL-2 E BAX: una possibile localizzazione di Bax e Bcl-2 dopo il trattamento termico è stata cercata con la microscopia confocale.

In tutte e tre le linee cellulari non trattate, Bcl-2 si trovava nel citoplasma (figura 13 A, D e G); al contrario delle cellule HL60 e HSB2, le cellule non trattate Kasumi-1 contenevano poco Bcl-2. Bax invece non era espresso (o addirittura assente) in tutte le cellule non trattate.

Dopo due ore dal trattamento termico, Bax aumenta uniformemente di 11.1 volte in HL60, 6.4 volte in HSB2 e 3 volte in Kasumi-1 (figura 13 B, E ed H). In tutte e tre le linee cellulari Bcl-2 si condensa nel citoplasma come conseguenza della perdita del volume cellulare dovuto all'apoptosi. Inoltre, Bcl-2 e Bax coesistono dopo il trattamento termico, come si vede in figura 13 B, E ed H.

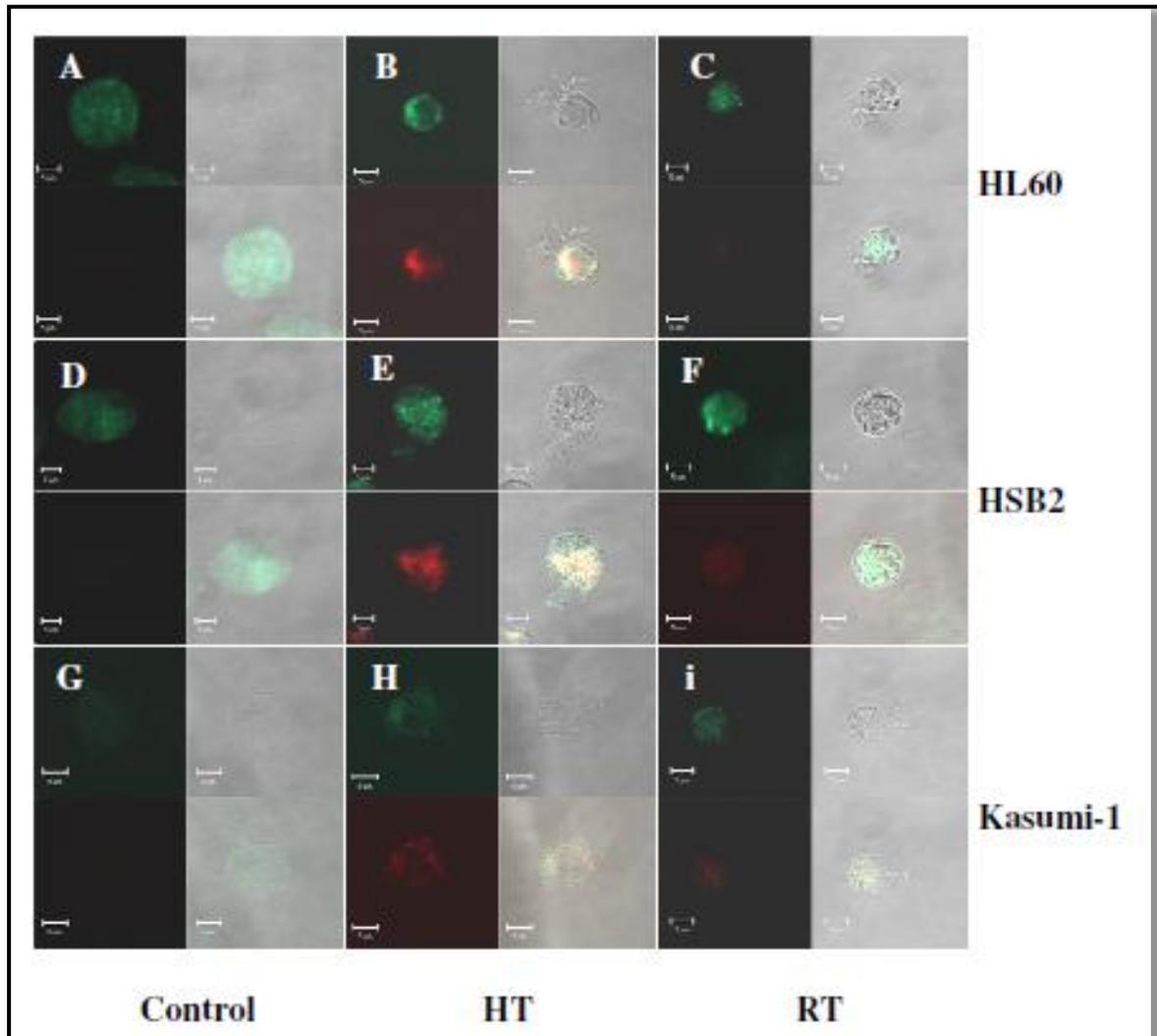


Figura 13: localizzazione ed espressione dei livelli di Bcl-2 e Bax. Le immagini di Bcl-2 (floreescenza verde) e di Bax (floreescenza rossa) si riferiscono alle linee cellulari HL60 (A, B, C), HSB2 (D, E, F) e Kasumi-1 (G, H, I) in una condizione di controllo (A, D, G), di trattamento con il calore (B, E, H) e di trattamento con raggi-X (C, F, I). [13.b]

RILASCIO DI CITOCROMO C NEL CITOSOL: il rilascio di citocromo c nel citosol attraverso la membrana mitocondriale esterna è stato monitorato con la citometria a flusso 6 ore dopo il trattamento di ipertermia. Nei campioni di controllo (cellule non trattate) al massimo il 10% delle cellule (su

10.000 cellule) rilascia il citocromo c. HL60 e HSB2 trattate termicamente mostrano un rilascio di citocromo c nel 50-60% delle cellule, contro circa il 90% delle Kasumi-1 (figura 14).

Le differenze nel rilascio di citocromo c sono strettamente correlate con le differenze nell'espressione di Bax (figura 12.a).

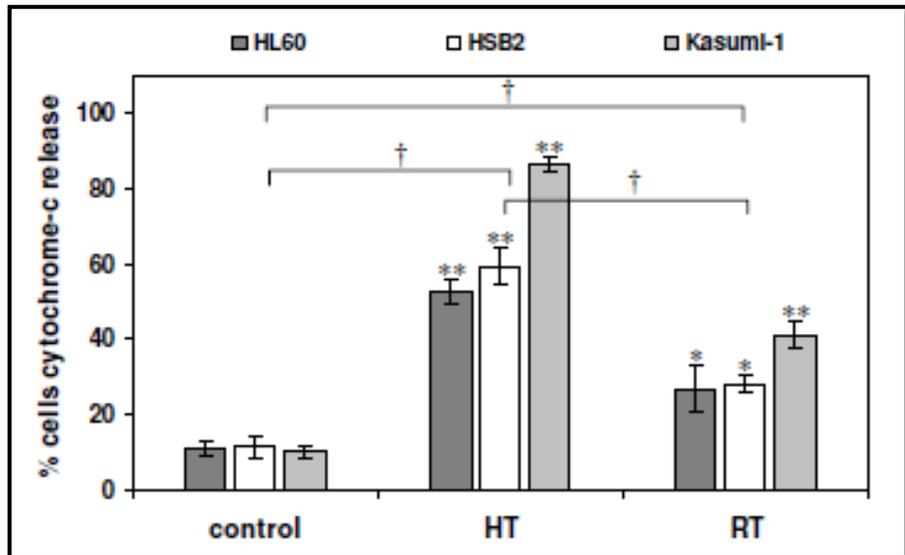


Figura 14: citocromo c rilasciato nel citosol. Percentuale di citocromo c rilasciato 6 ore dopo il trattamento termico (HT) e dopo irradiazione (RT) confrontata con le cellule non trattate. [13.b]

EFFETTI DI zVDVAD-FMK NELL'ESPRESSIONE DI BAX, RILASCIO DI CITOCROMO C E APOPTOSI: per capire il ruolo della caspasi-2 nell'apoptosi indotta da calore, sono stati studiati i livelli di Bax e di rilascio di citocromo c in presenza di un inibitore di caspasi-2, zVDVAD-fmk. Bloccando l'attivazione delle caspasi-2 aggiungendo l'inibitore prima del trattamento si ha per tutte e tre le linee cellulari una significativa inibizione dell'espressione di Bax (figura 15.A). Dopo il trattamento termico con l'inibitore zVDVAD-fmk la percentuale di cellule che mostrano un rilascio di citocromo c è fortemente calata, diventando prossima allo zero (figura 15.B).

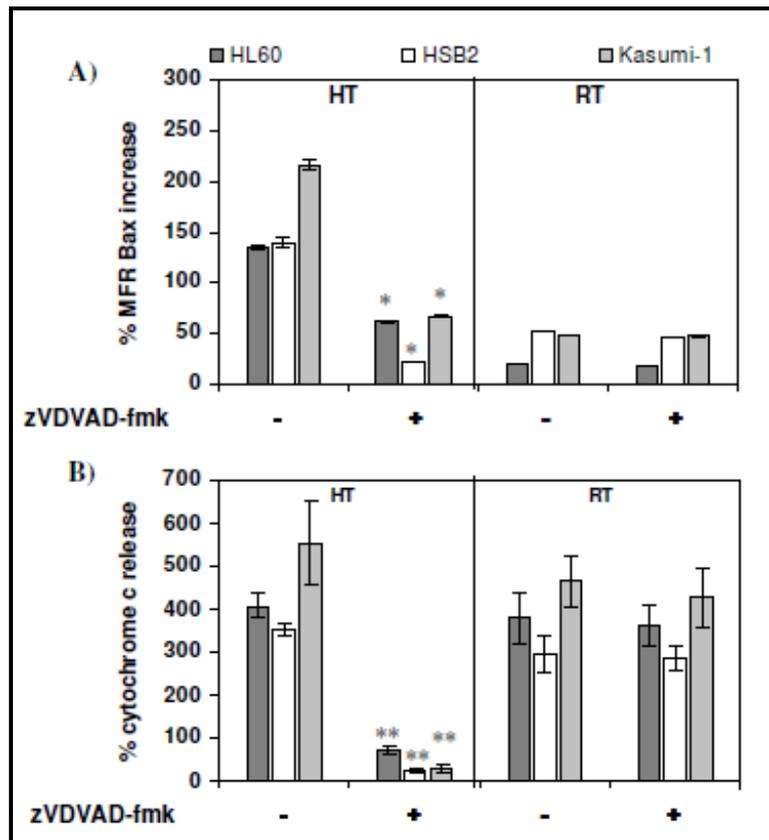


Figura 15: effetto dell'inibizione della caspasi 2 sull'espressione di Bax e sul rilascio di citocromo c. (A) Confronto tra la percentuale di cellule che presentano un aumento di Bax, trattate con ipertermia (HT) con e senza zVDVAD-fmk, e cellule trattate con irradiazione (RT) con e senza zVDVAD-fmk. (B) Confronto tra la percentuale di cellule che presentano rilascio di citocromo c trattate con ipertermia (HT) con e senza zVDVAD-fmk, e cellule trattate con irradiazione (RT) con e senza zVDVAD-fmk. [13.b]

4.3.3 Discussione

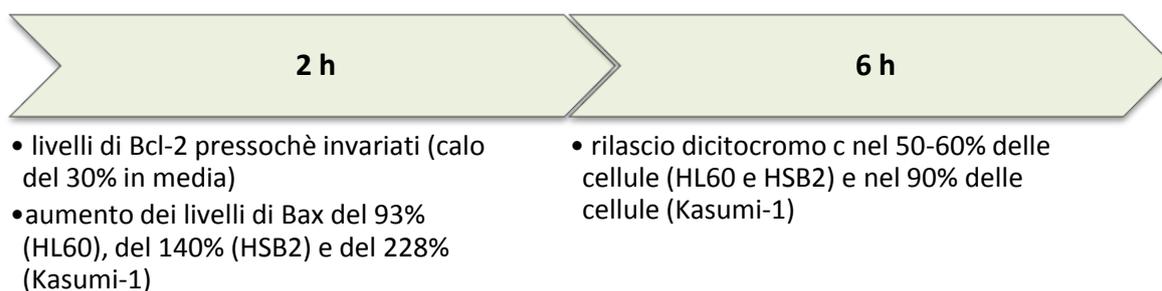
L'apoptosi indotta dalla "mild ipertermia" procede per la via mitocondriale e un passaggio fondamentale è l'attivazione, e la conseguente interazione, di Bax e Bcl-2 per permeabilizzare la membrana mitocondriale esterna. In questo studio è stato osservato che la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna è mediata da Bax e porta al rilascio di citocromo c. I livelli di Bax, ma non di Bcl-2, cambiano velocemente dopo l'esposizione delle cellule ad un aumento di temperatura a 43°C per un'ora. Questo aumento di Bax fa scattare il rilascio di citocromo c, molto probabilmente per la capacità di questa proteina di formare pori sulla membrana mitocondriale esterna. Come risulta dal minor rilascio di citocromo c, con l'attivazione dell'inibitore delle caspasi

Bax inibisce notevolmente la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna, MOMP¹⁰.

Questo è stato il primo studio in cui il ruolo della caspasi-2 nell'apoptosi indotta da calore è stata valutata specificatamente inibendone l'attivazione, mostrando così che ha un ruolo nella via mitocondriale di induzione dell'apoptosi, regolando la proteina Bax tramite Bid (proteina proapoptotica della famiglia Bcl-2) e indicando che la caspasi 2 è essenziale per la scissione da Bid a tBid (forma troncata della proteina Bid con la capacità di traslocare sul mitocondrio e favorire i cambiamenti conformazionali di altre molecole).

Inoltre, dai grafici mostrati nella figura 12 si può dedurre che l'aumento dei livelli della proteina Bax dipende dalla linea cellulare usata e dal tipo di trattamento impiegato; in particolare, le variazioni più consistenti dei livelli di Bax si verificano nella linea cellulare Kasumi-1 e, per quanto riguarda il trattamento di induzione dell'apoptosi usato (es.: calore), indipendentemente dal fatto che esso sia applicato singolarmente o in combinazione con l'irradiazione.

Tabella 4: eventi dopo 2h e 8h dal trattamento con ipertermia.



¹⁰ Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization

4.4 Localizzazione di Bcl-2 e Bax dopo l'ipertermia e il trattamento con un chemioterapico

Lo scopo di questo studio è quello di analizzare la localizzazione e Bcl-2 e Bax, mediatori chiave nel processo dell'apoptosi, dopo l'ipertermia e il trattamento con Paclitaxel, inibitore mitotico usato in chemioterapia. Sono state usate cellule PC-10 di un carcinoma che manifestava in modo molto marcato Bcl-2 e Bax nel citoplasma. [14]

4.4.1 Materiali e metodi

COLTURA CELLULARE: PC-10, cellule squamose di carcinoma;

TRATTAMENTO DI IPERtermIA E CON PAclITAxEL: Le cellule sono state fatte crescere in coltura per 48 ore a 37°C e successivamente sono state sottoposte ad un trattamento con ipertermia a 42.5°C per intervalli di tempo variabili, da un minimo di 0.5 ore ad un massimo di 6 ore. Dopo 6 ore di ipertermia le cellule sono state incubate nuovamente a 37°C per 24-72 ore. Le cellule sono state esposte al Paclitaxel a varie concentrazioni (10 nM - 10µM) per 24 ore o a 0.1µM per diversi intervalli di tempo, da un minimo di 0.5 ad un massimo di 60 ore. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti al massimo 3 volte.

TECNICHE DI ANALISI USATE: Le cellule sono state analizzate con la tecnica della citometria a flusso con Ioduro di Propidio in una stanza buia per 30 minuti. Inoltre è stato usato il metodo Western blotting e un microscopio confocale con scanner laser per osservare Bax e Bcl-2.

4.4.2 Risultati

ESPRESSIONE DI BCL-2 E BAX DOPO L'IPERtermIA

Come si può notare in figura 16, i livelli di Bcl-2 diminuiscono lievemente, a differenza dei livelli di Bax che aumentano gradatamente all'aumentare del tempo trascorso dopo il trattamento di ipertermia a 42.5°C (0h, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h). La determinazione della quantità di Bcl-2 e Bax rivela che, dopo 3 ore dal trattamento con ipertermia, livelli di Bax sono aumentati di circa 1.9 volte rispetto ai livelli presenti a 0h, mentre quelli di Bcl-2 sono diminuiti di 0.8 volte.

Conseguentemente, il rapporto tra i livelli di Bax e Bcl-2 aumenta progressivamente e, dopo 3 ore dal trattamento, è aumentato fino a 2.3 rispetto alle cellule che non hanno subito il trattamento con ipertermia.

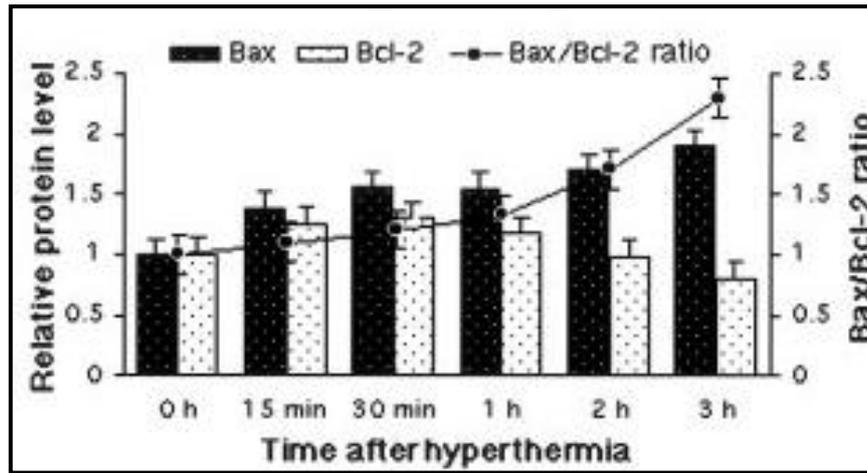


Figura 16: Analisi quantitativa dei livelli di Bax e Bcl-2, e del loro rapporto (Bax/Bcl-2 ratio) dopo l'ipertermia. [14]

LOCALIZZAZIONE INTRACELLULARE DI BCL-2 E BAX

Dopo entrambi i trattamenti si è visto che Bcl-2 si trova nel citoplasma delle cellule (dati non riportati). Bax è stato trovato nel citoplasma delle cellule non trattate né con ipertermia né con il farmaco (fig. 17 a ed f), mentre con l'ipertermia si nota un graduale e totale trasferimento di Bax dal citoplasma (fig. 17 b ed e) al nucleo dopo 2-3 ore (fig. 17 d ed e), con il trattamento con il farmaco non si ha uno spostamento della proteina dal citoplasma al nucleo.

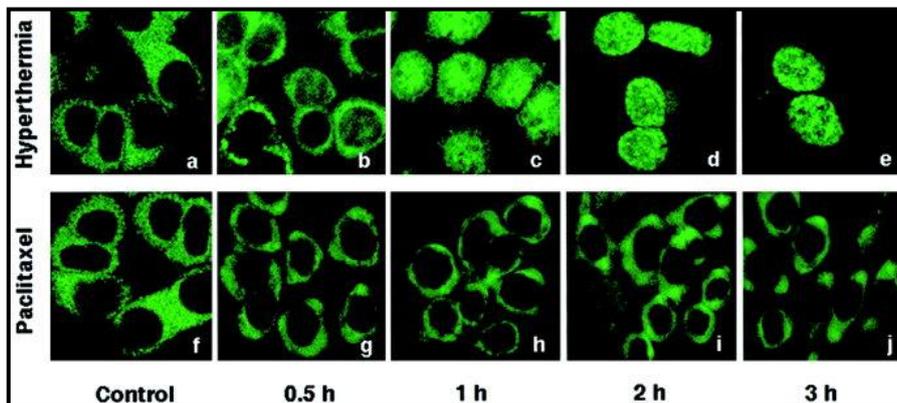


Figura 17: localizzazione di Bax durante l'ipertermia (a, b, c, d, e) e il trattamento con Paclitaxel (f, g, h, i, l) dopo 0.5h, 1h, 2h e 3h. Nelle cellule non trattate Bax si trova nel citoplasma e, dopo il trattamento con ipertermia, gradualmente si sposta nel nucleo. Nelle cellule trattate con il farmaco Bax rimane nel citoplasma. [14]

PERTURBAZIONI NEL CICLO CELLULARE E LOCALIZZAZIONE DI BAX

Trattando le cellule con ipertermia, è stato cercato il legame che intercorre tra la localizzazione di Bax e le perturbazioni nel ciclo cellulare. Nel caso dell'ipertermia quindi, dopo 3 ore dal trattamento, Bax si sposta nel nucleo e, continuando l'osservazione nelle ore successive, da quel momento in poi ritorna nel citoplasma, come mostrato in figura 18 A. Nelle cellule di controllo Bax si trova principalmente nel citoplasma, poi, nelle cellule trattate mediante ipertermia, si sposta gradualmente verso il nucleo nelle successive 6 ore. Dopo 24, 48 e 72 ore invece lo si trova maggiormente nel citoplasma.

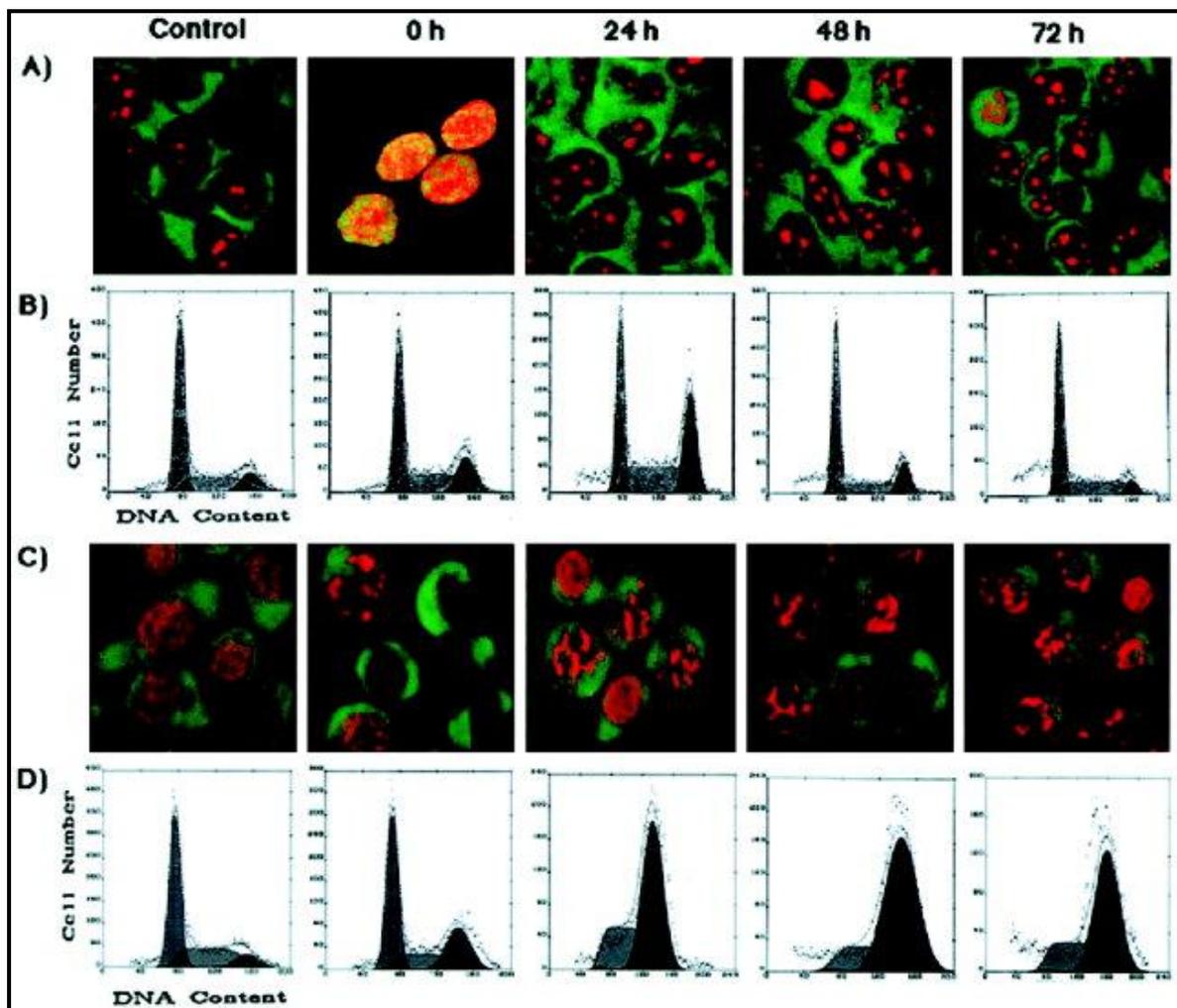


Figura 18: localizzazione di Bax e disturbo del ciclo cellulare dopo il trattamento con ipertermia (A e B) e con Paclitaxel (C e D). In verde (FITC) viene evidenziato Bax, mentre in rosso (PI) il DNA. L'istante di tempo 0h corrisponde in realtà a 6h. Gli istogrammi riportano in ordinata il numero di cellule e in ascissa il DNA contenuto, prima e dopo il trattamento con ipertermia (B) o con Paclitaxel (D). [14]

In figura 19 è riportata la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo in funzione del tempo trascorso dal trattamento con ipertermia e con il farmaco (0h, 24h, 48h, 72h). L'ipertermia induce un accumulo transitorio di cellule in fase G2/M fino alle 24 ore successive. Il numero di cellule in fase G2/M¹¹ diminuisce lievemente dopo 48-72 ore, per assestarsi infine ad un livello superiore rispetto a quello di partenza. Quest'aumento è molto più marcato nel trattamento con solo il farmaco (rispetto al trattamento con ipertermia) dove, dopo 24h, 48h e 72h le cellule in fase G1 sono quasi completamente scomparse.

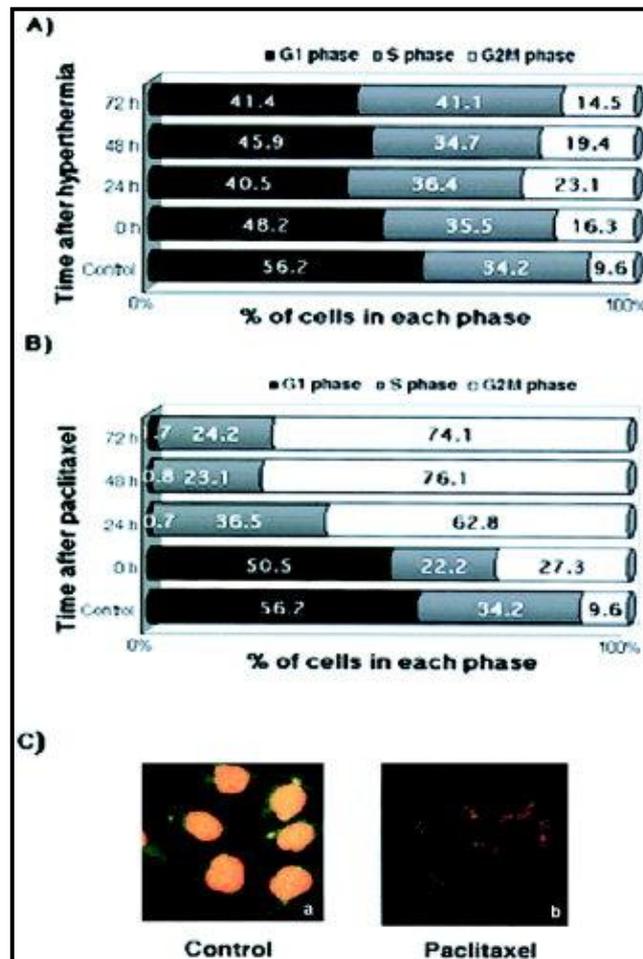


Figura 19: fasi del ciclo cellulare dopo l'ipertermia (A) e il trattamento con Paclitaxel (B). Gli istogrammi di DNA sono stati ottenuti colorando le cellule con PI e analizzandole poi con la citometria a flusso. Le proporzioni di cellule nelle fasi G1, S e G2M sono state calcolate con un computer. (C) immagini delle cellule trattate con FITC (verde) e PI (DNA, rosso). Le cellule esposte al Paclitaxel per 24 ore mostrano una frammentazione nucleare e la formazione di corpi apoptotici. [14]

¹¹ Fasi in cui avviene la sintesi di alcune proteine e la divisione cellulare.

4.4.3 Discussione

La localizzazione delle proteine della famiglia Bcl-2, incluso Bax, è la membrana mitocondriale esterna, e il ruolo principale di queste molecole è di regolare le attività mitocondriali durante la risposta apoptotica. È stato osservato che l'ipertermia causa uno spostamento graduale di Bax dal citoplasma al nucleo, mentre Bcl-2 continua a trovarsi nel citoplasma. Dal momento che si trovano in posti differenti, Bax non riesce a legarsi a Bcl-2, e questo può suggerire che l'ipertermia disturbi l'associazione tra i due. Questa dissociazione spinge Bax a spostarsi dal citoplasma al nucleo. Rimane tuttavia ignoto come l'ipertermia inibisca l'associazione tra i due e l'inserimento di Bax nella membrana mitocondriale (noto come il primo passaggio del processo apoptotico).

Ciò nonostante è stato ipotizzato che la proteina Bax necessiti di una proteina "partner" sconosciuta per essere attivamente trasportata nel nucleo. Si è visto che, dopo 30 minuti dall'ipertermia, Bax si accumula lungo la membrana del nucleo, per entrarci completamente dopo 3 ore. Ciò indica che Bax può comunque essere trasportato nel nucleo, anche se un "partner" dovrebbe essere essenziale.

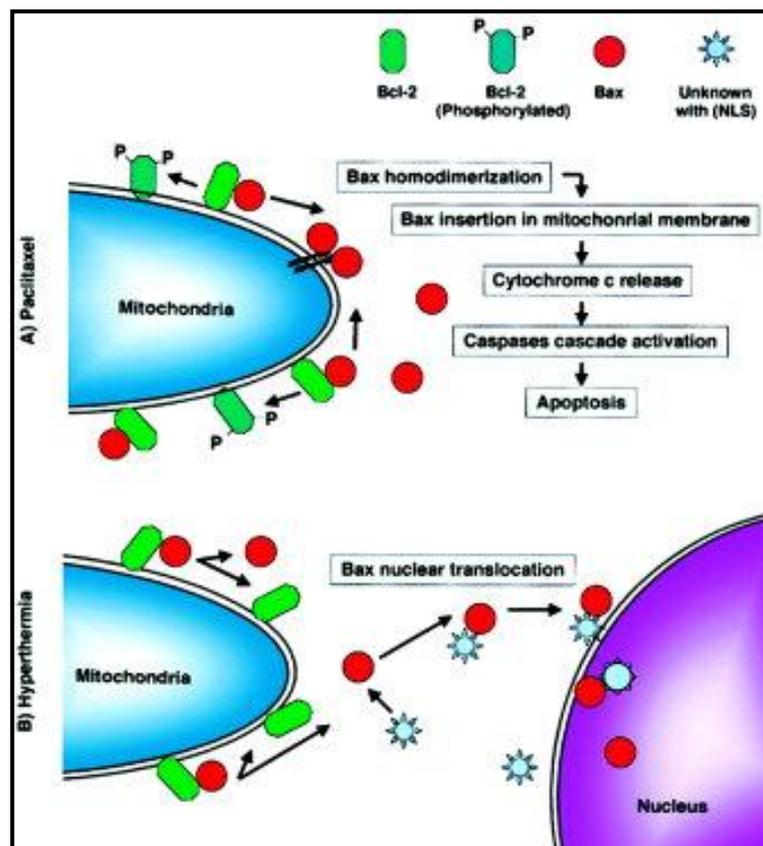
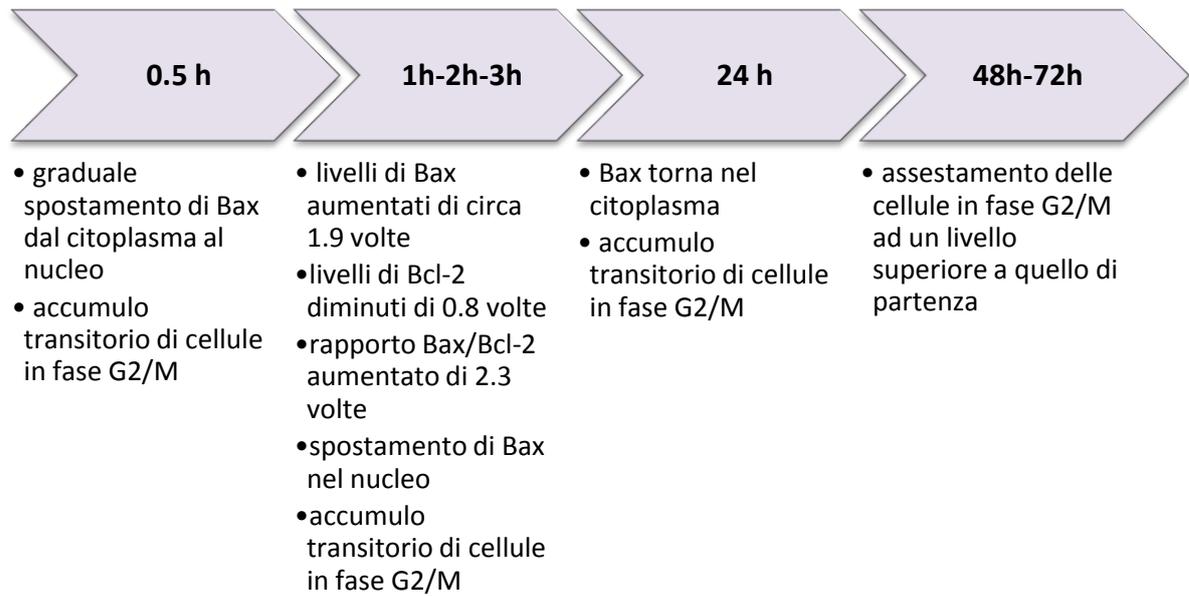


Figura 20: Rappresentazione schematica dell'interazione tra Bax e Bcl-2 dopo il trattamento con Paclitaxel (A) e ipertermia (B). [14]

Tabella 5: eventi dopo 0h, 0.5h, 1-2-3h, 24h e 48-72h dal trattamento con ipertermia.



4.5 Altri esperimenti

Si riportano altri risultati ottenuti in altri esperimenti per cui non è stato possibile recuperare l'articolo completo.

4.5.1. Ruolo dei mitocondri nell'apoptosi indotta da ipertermia

Per questi esperimenti è stata usata la linea cellulare L929, sottoposta a trattamenti termici a 43°C per 3 ore. Per l'analisi è stata usata la citometria a flusso. È stato studiato il ruolo dei mitocondri nell'apoptosi indotta da ipertermia. I risultati hanno indicato che l'ipertermia è in grado di depolarizzare il potenziale di membrana dei mitocondri e di rilasciare citocromo c nel citoplasma, in modo molto simile all'azione di TNF- α . [15]

4.5.2. Studio del danno mitocondriale nelle cellule CHO esposte ad ipertermia

Per questo studio è stato usato un microscopio elettronico che permette di visualizzare la struttura e la distribuzione tridimensionale dei mitocondri nelle cellule CHO successivamente al trattamento termico. Lo sviluppo del danno è stato osservato come un aumento della distorsione, del rigonfiamento e della dissociazione dei mitocondri.

I danni minimi si sono osservati a 42°C con esposizioni fino a 4 ore, mentre il danno più significativo è stato indotto a 43°C con un'esposizione di circa 30 minuti e a 45°C per più di 10 minuti. Per esposizioni moderate è stato osservato un parziale recupero dell'integrità mitocondriale, quando al trattamento termico è seguita un'incubazione di 24 ore a 37°C.

I danni mitocondriali sono correlati alla dose di calore e all'aumento della temperatura segue un maggior danno. [16]

4.6 Confronto tra gli esperimenti

Tabella 6: confronto tra gli studi riportati

| | Lavoro A [13.a] | Lavoro B [13.b] | | | Lavoro C [14] |
|-----------------------------|--|---|---|--|--|
| Cellule | HL60 | HL60 | HSB2 | Kasumi-1 | PC-10 |
| Temperatura | 43°C | 43°C | | | 42.5°C |
| Tempo di esposizione | 1 h | 1 h | | | Variabile : da 0.5h a 6h |
| Altro trattamento | Raggi-X | Raggi-X | | | Paclitaxel |
| Inibitore | zVAD-fmk (caspasi); zVDVAD-fmk (caspasi 2) | zVDVAD-fmk (caspasi 2) | | | |
| Colorante | JC-1 | Annexin V con FITC; Ioduro di propidio | | | Ioduro di propidio |
| Metodo di analisi | Citometria a (quantificazione di Bax e Bcl-2); FLICA (caspasi) | Citometria a flusso (quantificazione di Bax, Bcl-2 e citocromo c); Microscopia confocale (localizzazione di Bax e Bcl-2) | | | Citometria a flusso; Western blotting; Microscopio confocale con scanner laser |
| Osservazioni | Mitocondrio | | | | |
| | Diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\Psi$ | Rilascio di citocromo c nel 50-60% delle cellule (ipertermia) | Rilascio di citocromo c nel 50-60% delle cellule (ipertermia) | Rilascio di citocromo c nel 90% delle cellule (ipertermia) | |
| | Aumento della permeabilità della membrana mitocondriale esterna | Significativa riduzione delle cellule che presentano rilascio di citocromo c bloccando l'attivazione della caspasi2 | | | |
| | Dopo 8h dal trattamento si ha la depolarizzazione della membrana mitocondriale esterna | | | | |

| Bax | | | | |
|---|---|---|--|--|
| Aumento dei livelli fino al 250% | Aumento del 93% (espressione) | Aumento di circa il 140% (espressione) | Aumento del 228% (espressione) | Aumento dei livelli proporzionalmente al tempo trascorso dopo l'esposizione |
| | Aumento dei livelli di Bax indipendentemente dall'ordine di applicazione di calore e irradiazione | | | Aumento massimo dei livelli di Bax dopo 3 ore dall'esposizione al calore |
| | Nelle cellule non trattate non era espresso | | | Bax rimane nel citoplasma dopo l'uso del farmaco |
| | Aumento dei livelli di 11.1 volte (localizzazione) | Aumento dei livelli di 6.4 volte (localizzazione) | Aumento dei livelli di 3 volte (localizzazione) | Trasferimento di Bax nel nucleo dopo 2-3 h dall'applicazione dell'ipertermia; ritorno di Bax nel citoplasma nelle ore successive |
| | Inibizione dell'espressione di Bax bloccando l'attivazione della caspasi2 | | | |
| Bcl-2 | | | | |
| Calo dei livelli di Bcl-2 di circa il 35% rispetto ai livelli iniziali, dopo 2h dal trattamento | Calo dei livelli di Bcl-2 di circa il 35% rispetto ai livelli iniziali, dopo 2h dal trattamento | | | Lieve diminuzione dei livelli di Bcl-2 |
| | Nelle cellule non trattate Bcl-2 si trova nel citoplasma | | | Bcl-2 si trova nel citoplasma sia dopo il trattamento con calore sia con il farmaco |
| | | | Livelli di Bcl-2 iniziali inferiori rispetto a quelli di HL60 e HSB2 | |
| | Condensazione di Bcl-2 nel citoplasma | | | |
| Altro | | | | |
| Dopo 8h si ha l'esternalizzazione di PS e presenza di caspasi attive | Coesistenza di Bcl-2 e Bax dopo il trattamento termico | | | Aumento delle cellule in fase G2/M dopo ip. |
| | | | | Aumento delle cellule in fase G2/M e scomparsa di quelle in fase G1 con farmaco |

| | | | |
|--------------------|--|--|--|
| Conclusioni | Esistenza di un legame tra $\Delta\Psi$, le caspasi e l'esternalizzazione della PS | Legame tra l'espressione di Bax e il rilascio di citocromo c | L'ipertermia disturba l'associazione di Bax e Bcl-2 |
| | Il cambiamento del $\Delta\Psi$ non richiede l'attivazione delle caspasi | Permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna è mediata da Bax | Necessità di Bax di avere una proteina "partner" a cui legarsi |
| | L'inibizione della caspasi2 blocca la rottura della MMP | Permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna porta al rilascio di citocromo c | |
| | zVAD-fmk riduce l'esternalizzazione di PS | Caspasi2 regola la proteina Bax tramite Bid | |
| | | Caspasi2 essenziale per la scissione tra Bid e tBid | |
| | L'aumento dei livelli di proteina Bax dipende dalla linea cellulare e dal trattamento di induzione dell'apoptosi usati | | |

Tabella 7: confronto tra gli studi riportati

| | Lavoro D [15] | Lavoro E [16] |
|-----------------------------|---|--|
| Cellule | L929 | CHO |
| Temperatura | 43°C | 42°C (4 h) 43°C (30min) 45°C (oltre 10min) |
| Tempo di esposizione | 3 h | Variabili: da 10min a 4h |
| Osservazioni | | Il danno mitocondriale si è presentato come aumento della distorsione, del rigonfiamento e della dissociazione |
| | | Danni minimi ai mitocondri per esposizione a 42°C per 4h |
| | | Danni significativi ai mitocondri per esposizione a 43°C per 30min e a 45°C per più di 10min |
| | | Recupero parziale dell'integrità mitocondriale per esposizioni moderate, dopo l'incubazione a 37°C per 24h |
| Conclusioni | L'ipertermia depolarizza il potenziale di membrana dei mitocondri | I danni mitocondriali sono correlati alla dose di calore |
| | L'ipertermia induce il rilascio di citocromo c in modo simile all'azione di TNF- α | |

5. Calore e blebbing

5.1. Cosa sono i blebs?

I blebs sono escrescenze sferiche della membrana plasmatica che sono dovuti al distacco della membrana dal citoscheletro sottostante. Sono solitamente visti come un segno di apoptosi, ma sono stati osservati anche durante alcuni tipi di migrazione cellulare e durante la divisione cellulare.

I blebs hanno inizio dalla perdita di adesione del citoscheletro, probabilmente dovuto all'incremento della contrattilità dello stesso. La membrana liberata si gonfia rapidamente (30 secondi) in un bleb sferico. L'espansione del bleb si ferma per un calo della pressione interna alla cellula, oppure per la formazione di un nuovo raggruppamento di actina sulla membrana del bleb. [17, 18]

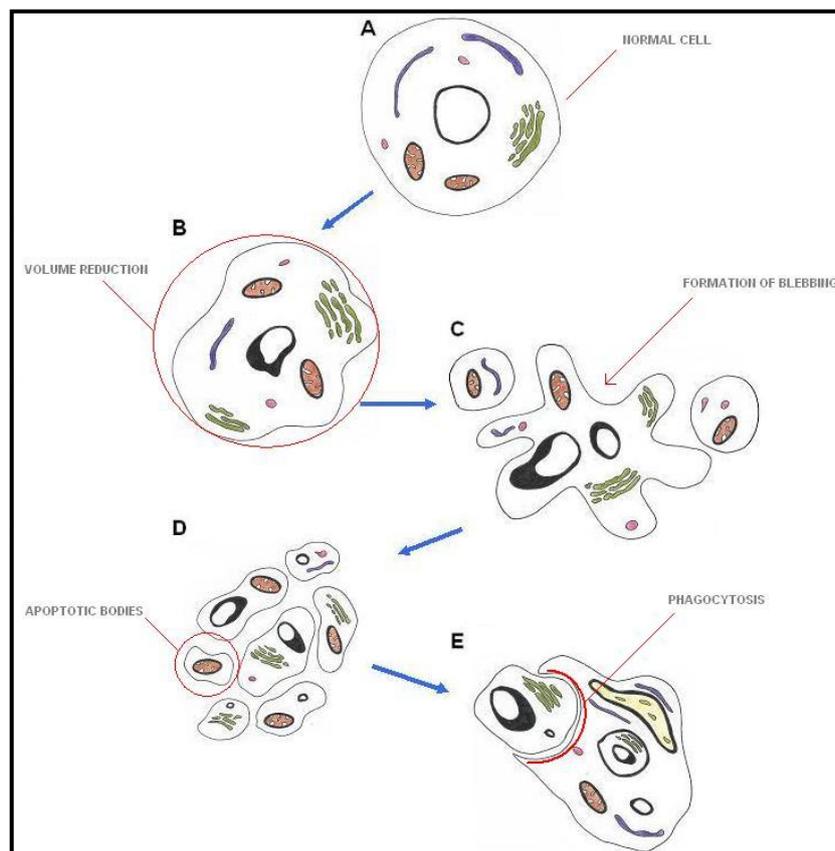


Figura 21: Diagramma dell'apoptosi con particolare riferimento al blebbing. [19]

5.2. Dinamica del bleb

5.2.1. Nucleazione

Durante il blebbing, la pressione p prodotta dalle proteina motore nel citoscheletro, miosina, coinvolta in quasi tutti i fenomeni di contrattilità [10], opera per ridurre l'actina corticale, proteina anch'essa responsabile della contrazione muscolare [10], dando origine ad una compressione centripeta localizzata del citoplasma. Dal momento che il citosol non può defluire istantaneamente all'interno del bleb, si presenta una pressione transitoria e, se questa è sufficientemente grande, il doppio strato di membrana si strappa dalla corteccia di actina fino a formare un bleb; se così non è, il citosol defluisce dall'area compressa e dà origine ad un locale incremento della pressione intracellulare. [20]

Il diametro critico d della membrana che si stacca dalla corteccia, necessario perché il bleb cresca, viene stimato considerando il cambiamento dell'energia libera del sistema, U :

$$U \approx pd^2\delta - Jd^2 - \frac{B\delta^2}{d^2} - T\delta^2 \quad (1)$$

in cui si individuano 4 componenti:

1. $pd^2\delta$: **lavoro pressione-volume** compiuto dalla contrazione, con p la pressione idrostatica nel citosol, δ la deflessione perpendicolare della membrana alla corteccia, tale che il volume del bleb sia $d^2\delta$;
2. Jd^2 : **perdita di adesione** del doppio strato su un'area d^2 , con J l'energia di adesione tra membrana e citoscheletro;
3. $\frac{B\delta^2}{d^2}$: **curvatura del doppio strato** con una curvatura rigida B di circa δ su un'area d^2 ;
4. $T\delta^2$: **lavoro compiuto per lo stiramento** durante la formazione della vescicola, con T la tensione di membrana. [20]

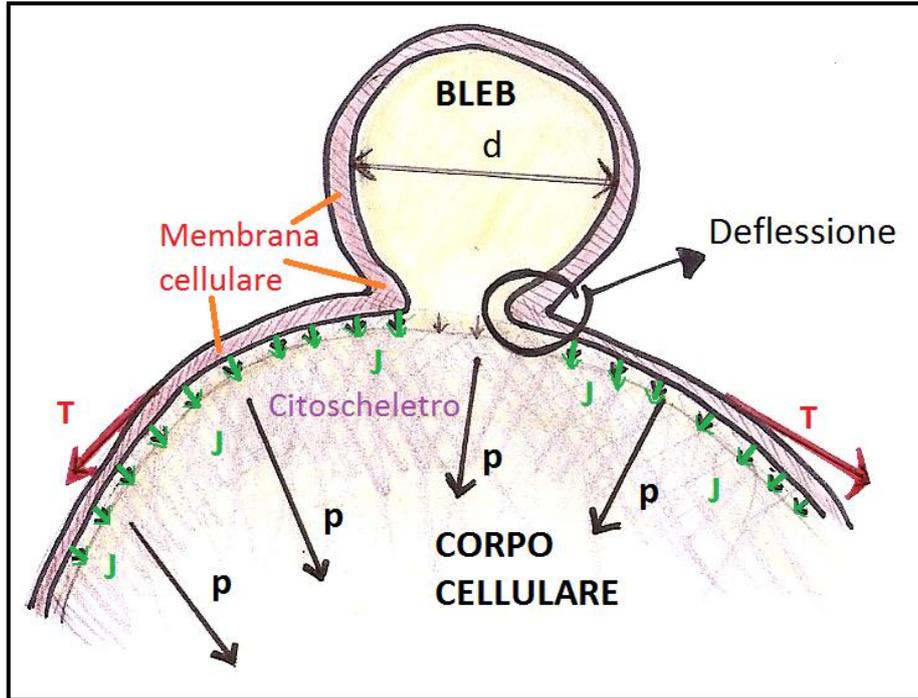


Figura 22: variabili da cui dipende l'energia libera del sistema U .

Dal momento che la maggior parte della membrana plasmatica è tenuta nella forma ripiegata dal citoscheletro, la membrana non riesce a dispiegarsi e scorre per favorire la formazione del bleb, mantenendo una tensione di membrana T pressoché costante (se valutata per piccoli spostamenti). Anche la pressione è circa costante per un breve intervallo di tempo dopo la comparsa del bleb. Inoltre, per piccoli valori della deflessione δ , l'energia necessaria al ripiegamento è trascurabile poiché inferiore rispetto a quella necessaria per l'allungamento. La dimensione critica di distacco al di sopra della quale il bleb crescerà in una condizione di pressione controllata, può essere ottenuta minimizzando l'energia libera (1) rispetto ai cambiamenti nella dimensione e nella deflessione, in modo che $(\partial U/\partial d) = (\partial U/\partial \delta) = 0$.

Tutto ciò porta alla relazione che lega il diametro critico d_c della membrana che si stacca, e la deflessione δ_c necessaria perché il bleb si formi e cresca:

$$d_c \sim \left(\frac{TJ}{p^2}\right)^{1/2} \sim \frac{J}{p} \quad (2)$$

Come si può dedurre da (2), la grandezza della bolla è inversamente proporzionale alla pressione di contrazione p e direttamente proporzionale all'energia d'adesione J . [20]

5.2.2. Crescita

Al crescere del volume anche la superficie del bleb deve aumentare dato che la membrana lipidica non si può allungare, e ciò può avvenire secondo alcuni meccanismi:

- dal momento che la cellula ha un eccesso di membrana rispetto al suo volume di partenza in cui era in condizione isotonica, la formazione del bleb può semplicemente essere il risultato di un locale livellamento della membrana della cellula;
- finché la membrana è un fluido bidimensionale, la crescita del bleb può essere il risultato di un flusso della membrana attraverso il collo del bleb;
- potrebbe, infine, risultare dal distacco della membrana cellulare dovuta alla riduzione di actina corticale.

L'estensione della lacerazione può essere valutata sperimentalmente misurando il diametro del collo del bleb durante l'espansione e l'aumento del dispiegamento della membrana, come la misura del rapporto tra il perimetro e il collo del bleb (figura 24). Se il dispiegamento della membrana è la maggior causa dell'aumento dell'area, il rapporto potrebbe rimanere costante; altrimenti, se i lipidi di membrana si spostano nel bleb, questo rapporto può aumentare nel tempo.

Al procedere della crescita del bleb accade che:

- il diametro del collo aumenta all'incirca del doppio;
- il perimetro quintuplica;
- il rapporto perimetro/collo del bleb aumenta quasi di tre volte.

Nella condizione in cui è presente una lacerazione del citoscheletro e il flusso della membrana favorisce un aumento rapido dell'area superficiale del bleb, sono possibili due differenti processi di crescita:

1. se la crescita è lenta, l'aumento del volume aumenta la tensione di membrana causando un flusso di lipidi nel bleb attraverso il collo, aumentando l'area della superficie per adattarsi all'espansione;
2. se la crescita è più rapida, la tensione di membrana diventa sufficiente a rompere i legami tra la membrana e l'actina corticale, e il diametro del collo aumenta.

La lacerazione si presenta se

$$f = T_m(1 - \cos(\alpha)) > J \quad (3)$$

con f la densità di forza esercitata dalle proteine motore, T_m la tensione di membrana, α l'angolo tra la membrana del bleb e il corpo cellulare, e J l'energia di adesione tra la membrana e la corteccia. [20]

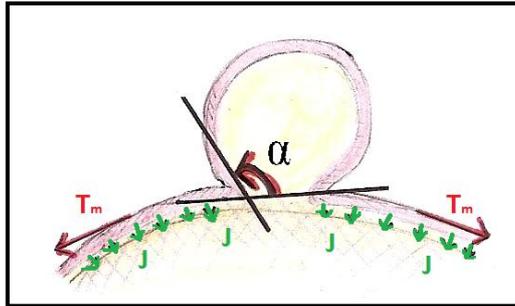


Figura 23: l'angolo α è delimitato dalla tangente alla membrana cellulare in un punto prossimo al ripiegamento e dalla tangente al bleb in quel punto. In figura sono indicate anche la tensione di membrana T_m e l'energia di adesione J .

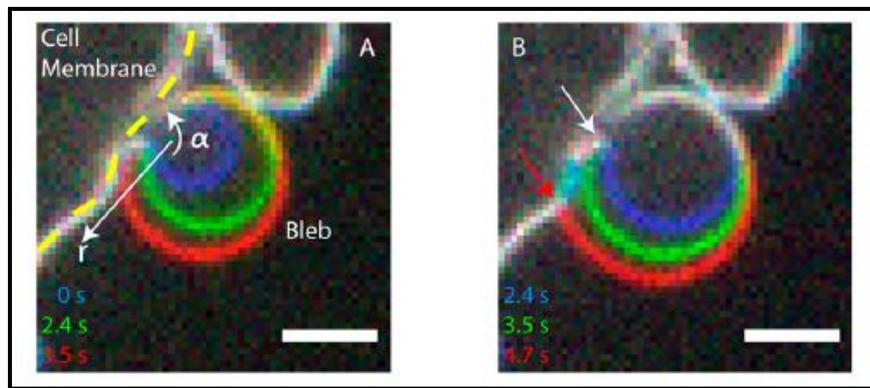


Figura 24: meccanismo di crescita del bleb. (A) La linea gialla tratteggiata indica la membrana cellulare, mentre in blu, verde e rosso vengono mostrate tre posizioni del bleb rispettivamente a 0s, 2.4s e 3.5s. All'aumentare del volume del bleb, l'angolo di contatto α tra la membrana del bleb e il corpo cellulare aumenta. (B) Per i primi due istanti di tempo in cui è stata valutata la posizione del bleb (blu 2.4s e verde 3.5s), il punto di contatto tra la membrana del bleb e il corpo cellulare è indicato dalla freccia bianca. Per l'ultimo istante (rosso 4.7s) il punto è indicato dalla freccia rossa, che è chiaramente distinto dal punto precedente. L'aumento del volume può causare la lacerazione della membrana dal corpo cellulare. [20]

5.2.3. Fine della crescita del bleb

La crescita del bleb termina per uno di questi motivi:

- la pressione locale di transizione scende sotto quella di soglia necessaria per la crescita e il bleb raggiunge un equilibrio dove questa pressione è bilanciata da una combinazione della tensione di membrana e dalla curvatura;
- il riassetto del citoscheletro corticale può limitare la crescita del bleb prima che la pressione diminuisca troppo. [20]

5.3. Correlazione tra il blebbing della membrana indotto dall'ipertermia e la sopravvivenza cellulare

In questo studio sono state utilizzate le cellule che si trovavano nella fase G1: sono state scaldate a 45.5°C per 3-20 minuti per analizzare i diversi gradi di blebbing, partendo da cellule che non manifestano il fenomeno e arrivando a bleb più grandi delle stesse cellule. [18]

5.3.1 Materiali e metodi

COLTURA CELLULARE: linea cellulare ovarica di criceto cinese (CHO = Chinese Hamster Ovary).

SINCRONIZZAZIONE CELLULARE E RISCALDAMENTO: la sincronizzazione delle cellule è stata ottenuta con una tecnica di selezione mitotica. La temperatura è stata fatta salire da 37°C a 45.5°C in 2 minuti e 20 secondi immergendo il contenitore con le cellule in un bagno di acqua distillata a 50°C. Successivamente il contenitore è stato posto in un bagno di acqua mantenuta a 45.5±0.05°C per il resto del periodo di tempo desiderato, dopo il quale è stato trasferito in un bagno a 32.0±0.05°C per riportare le cellule ad una temperatura media di 37°C in 2.5 minuti.

STRUMENTI USATI:

- Microscopio elettronico a scansione (SEM);
- Microscopio ottico (LM);
- Microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

ANALISI DEL BLEB: subito dopo il riscaldamento una parte delle cellule è stata prelevata e analizzata con un microscopio a contrasto, mentre un'altra parte è stata posta in centrifuga. Entrambi i campioni poi sono stati portati a 4°C, temperatura che causa il collasso della membrana dei blebs. Il grado di manifestazione del blebbing è stato definito su un sistema basato su una scala da 1 a 6 (tabella 3).

Tabella 8: classificazione dei gradi di blebbing.

| Grado | Rapporto tra bleb maggiore e diametro della cellula | Caratteristiche particolari |
|-------|---|---------------------------------------|
| 1 | 0 | Assenza di blebs/cellule di controllo |
| 2 | <0.20 – 0.25 | |
| 3 | 0.25 – 0.45 | |
| 4 | 0.45 – 0.60 | |
| 5 | 0.60 – 0.80 | |
| 6 | > 0.80 | |

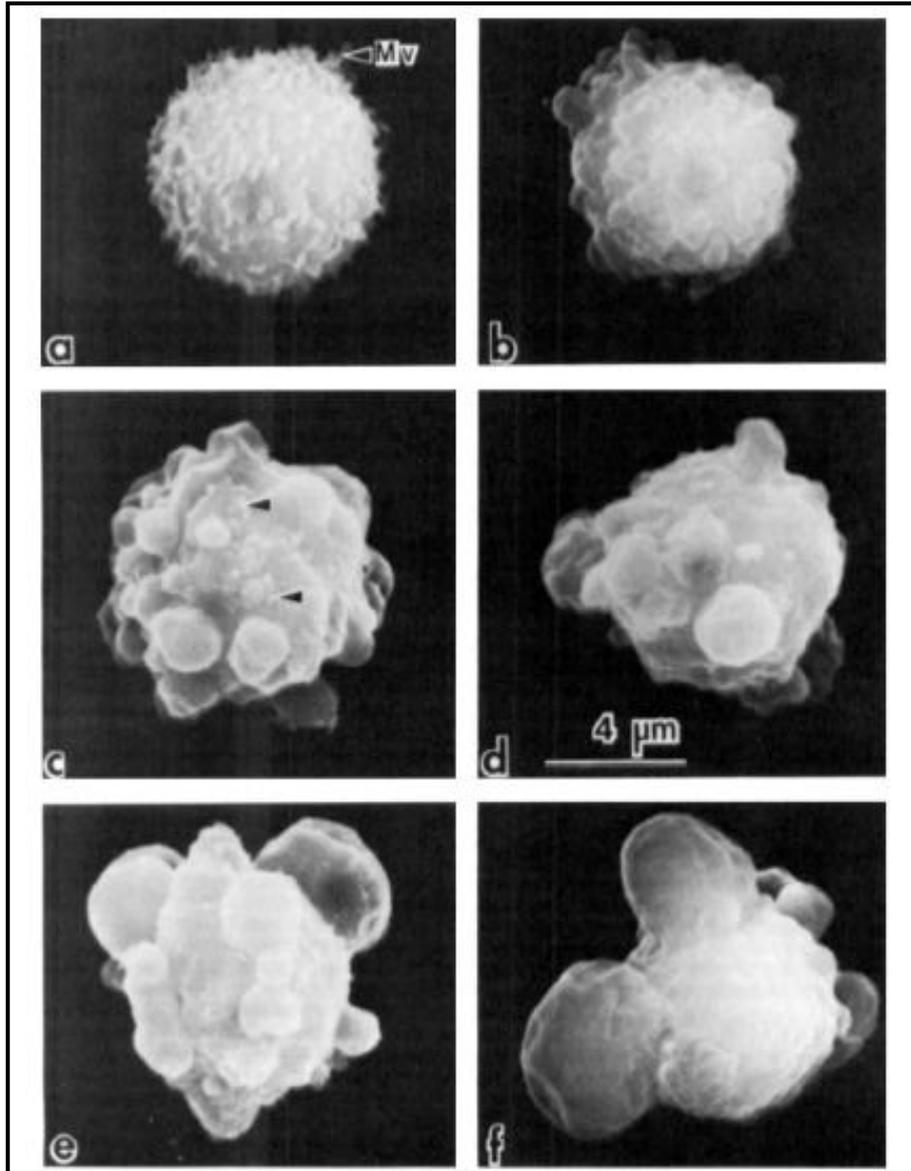


Figura 25: immagini di cellule scaldate in sospensione a 45.5°C per 10 minuti che illustrano il sistema usato per classificare i gradi di blebbing (immagini ottenute con SEM). (a) STATO 1: blebs indistinguibili dalla cellula di controllo. La superficie della cellula presenta molti microvilli. (b) STATO 2: presentano piccoli blebs sulla superficie, il più grande dei quali ha un diametro che non supera il 25% del diametro della cellula. (c) STATO 3: i blebs maggiori non superano il 45% del diametro dell'intera cellula. (d) STATO 4: i blebs maggiori hanno un diametro che non supera il 60% di quello della cellula; si notano ancora dei microvilli. (e) STATO 5: sembra che un alone di blebs circonda la cellula. I blebs più grandi sono all'incirca l'80% della cellula. (f) STATO 6: il numero di blebs sulla cellula si riduce, mentre la grandezza di quelli rimanenti aumenta fino a quando il loro diametro supera l'80% del diametro della cellula. [18]

5.3.2 Risultati

Sulla superficie delle cellule trattate con ipertermia sono state osservate diverse tipologie di blebbing al variare del tempo del trattamento termico, pur essendo mantenute alla stessa temperatura di 45.5°C. Le cellule che presentano i blebs all'interno della popolazione delle cellule scaldate tendono ad appartenere ai valori maggiori della scala se il trattamento termico a 45.5°C viene protratto da 7.5 a 12.5 minuti.

Entro un'ora dopo la somministrazione del calore la maggior parte dei blebs si sono riassorbiti o si sono staccati dalla cellula e, per questo motivo, cellule che avrebbero dovuto avere un punteggio maggiore si trovano assegnato uno dei più bassi.

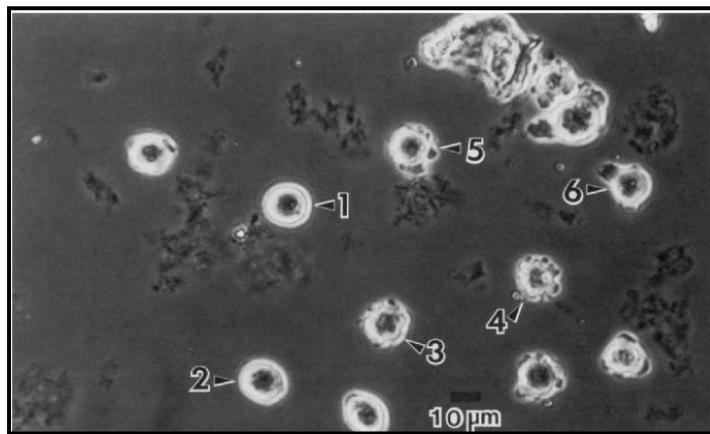


Figura 26: i diversi gradi di blebbing (1 – 6) che mostrano le cellule scaldate per 10 minuti a 45.5°C. [18]

La percentuale delle cellule riscaldate che si trovano al grado 1, 2, 3 corrisponde alla percentuale di cellule che sopravvivono ad ogni trattamento di calore.

Solo per durate del trattamento di 18 e 20 minuti, quando i blebs cominciano a scomparire, i due valori si differenziano significativamente. Come regola generale, la maggior parte dei blebs minori (grado 2 e 3) tendono ad essere riassorbiti, mentre alcuni dei blebs più grandi si staccano dalla corpo cellulare. La verifica di questa relazione tra lo stato del blebbing e la sopravvivenza è stata ottenuta dall'osservazione delle singole cellule poste su un supporto di vetro¹² subito dopo il riscaldamento. Successivamente è stato osservata la formazione o meno di colonie macroscopiche: circa il 70% dei supporti conteneva una cellula, mentre le rimanenti fino a tre con lo stesso grado di blebbing. In questo modo, anche se nel vetrino erano presenti più cellule, le informazioni ricavate erano uguali a quelle ricavabili dalla singola cellula. Dai risultati riportati sono stati eliminati quelli ottenuti per un'esposizione superiore ai 12.5 minuti perché, rispetto alla scala di riferimento, sarebbero risultati errati. In nessun caso le cellule di grado 5 o 6 sono

¹² Vetrini costruiti dagli autori dell'esperimento appositamente per isolare le singole cellule

sopravvissute per formare una colonia, mentre più del 90% del grado 3 sono sopravvissute. La soglia tra sopravvivenza e non sopravvivenza si pone tra il grado 3 e 4, dal momento che la piccola percentuale di cellule di grado 4 che sono sopravvissute (5%), con buona probabilità, sarebbe dovuta appartenere al grado 3 (figura 27).

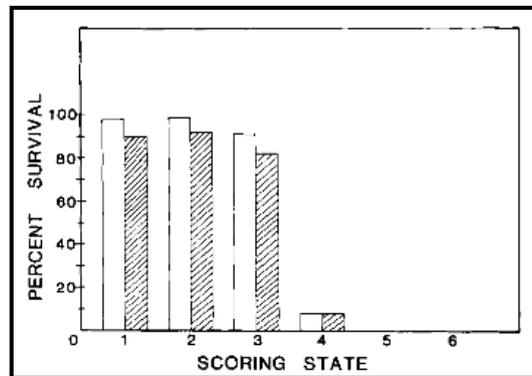


Figura 27: sopravvivenza delle singole cellule. I dati relativi alle colonne tratteggiate sono si basano su tutti gli esperimenti (da 7.5 a 20 minuti), mentre le colonne bianche escludono i dati relativi ad esperimenti di durata superiore a 12.5 minuti. Le cellule sopravvivono se il loro grado di blebbing è 1, 2 o 3; le cellule che risultano classificate di grado 4 sono delle cellule di grado 3 classificate in modo errato. [18]

Nelle cellule di controllo è stato osservato che:

- i mitocondri e il reticolo endoplasmatico si sono distribuiti uniformemente nel citoplasma (figura 28.a);
- la condensazione della cromatina è localizzata lungo il perimetro del nucleo;
- i nucleoli si sono mostrati sia sotto forma filamentosa sia granulare
- i ribosomi erano a grappoli nel citoplasma, mentre quelli liberi mostravano le tipiche caratteristiche dei polisoma, cioè catene di 5-20 ribosomi (figura 28.b).

Le cellule sottoposte a ipertermia mostravano invece:

- mancanza di mitocondri e di reticolo endoplasmatico all'interno dei blebs (figura 28.c e 28.d);
- ribosomi liberi nel bleb senza strutture polisomiali;
- pochi ribosomi uniti al reticolo endoplasmatico (figura 28.d);
- condensazione della cromatina, lungo il perimetro del nucleo, ridotta o scomparsa
- i nucleoli sono più omogenei, presentandosi principalmente nella struttura filamentosa piuttosto che in quella granulare

Nonostante non sia stata trovata la correlazione tra il grado di blebbing e l'entità del danno morfologico intracellulare, è stato constatato che le cellule classificate con un grado minore

presentano le caratteristiche sopra riportate in modo poco accentuato rispetto a quelle di grado superiore. La morfologia delle cellule riscaldate di grado 1 è pressoché identica a quella delle cellule di controllo.

La membrana delle cellule è stata studiata con il metodo del “freeze fracturing”. Questa tecnica consiste nell’ottenere un calco della superficie di frattura della cellula dopo averla congelata rapidamente a temperature bassissime [22], in particolare in questo studio le cellule sono state portate a -105°C e a -110°C. Nella cellula mostrata in figura 29 si notano tre grandi blebs e dei segni lasciati dai microvilli, quando probabilmente si sono rotti durante il processo di congelamento. In figura 25.b, c, e sono mostrati gli ingrandimenti delle rispettive aree mostrate in figura 25.a, mentre in figura 25.d è mostrata una porzione della membrana di una cellula di controllo.

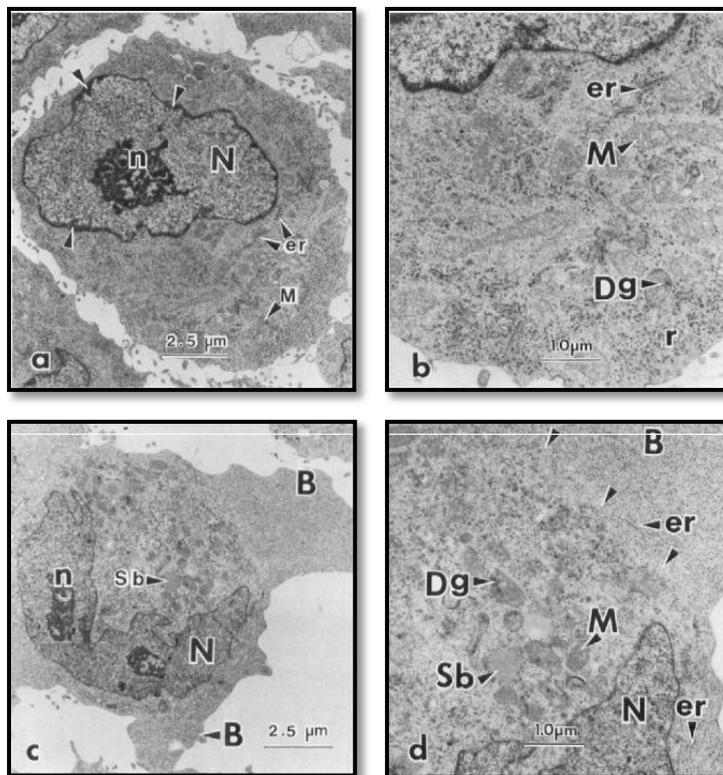


Figura 28: gli organelli subcellulari, come mitocondri (M) e il reticolo endoplasmatico (re), sono distribuiti uniformemente nel citoplasma della cellula di controllo. La condensazione della cromatina lungo il perimetro del nucleo è indicata dalle frecce, e il nucleolo (n) ha un aspetto filamentoso (a). Un maggior ingrandimento (b) mostra la struttura dei polisoma (r). In alcuni mitocondri sono presenti dei granuli densi (Dg). (c) In questa cellula, con un grado di blebbing pari a 4, si nota la condensazione degli organelli subcellulari, lasciando all’interno del bleb (B) solo i ribosomi. Il nucleolo appare più omogeneo e appaiono corpi sferici (Sb). [18]

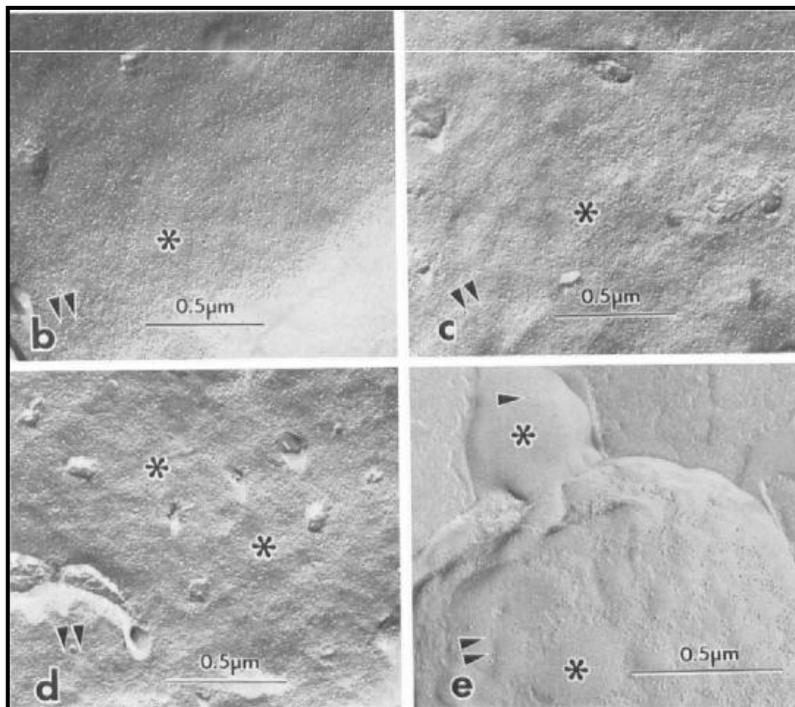
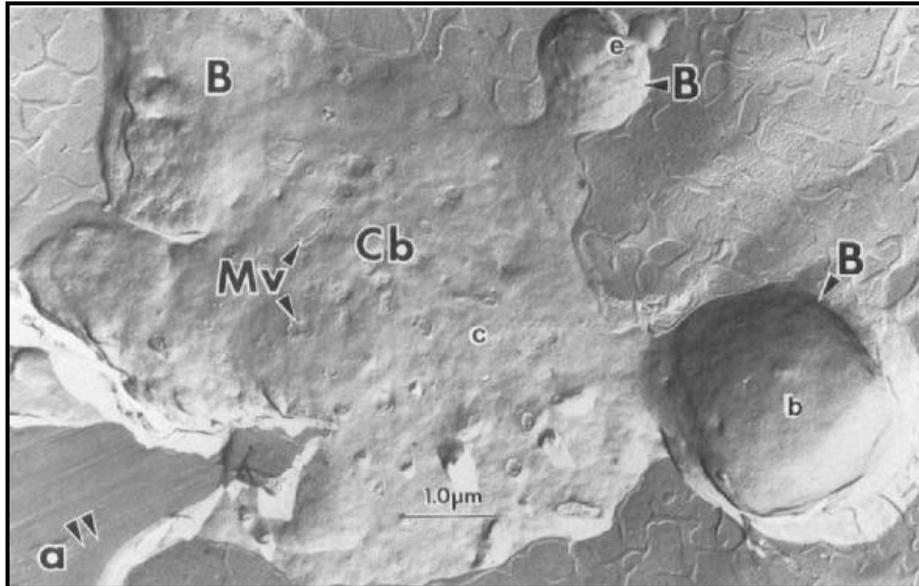


Figura 29: immagini ottenute con il metodo del "freeze fracture". (a) Si notano i blebs (**B**) e i segni lasciati dai microvilli (**Mv**) sul corpo cellulare (**Cb**). Le lettere **b**, **c**, **e** si riferiscono agli ingrandimenti riportati nei rispettivi riquadri. (d) cellula di controllo. Le due frecce indicano la direzione dell'ombra. Gli asterischi indicano zone dove l'ombra delle particelle ha la stessa lunghezza e non c'è differenza nella densità delle particelle nel bleb e nella cellula (b, c) rispetto a quanto osservato nella cellula di controllo (d). [18]

5.3.3 Discussione

I risultati di questo studio hanno portato a dimostrare che c'è un legame tra il grado di blebbing sulla superficie delle cellule e il tasso di mortalità. Quando le cellule sono state portate a temperatura ambiente (24 – 26°C) hanno riassorbito i blebs, indicando che probabilmente la cellula necessita di energia per portare a termine il distacco del bleb e, come molti processi cellulari attivi, anche questo processo è dipendente dalla temperatura.

Questo fenomeno è valido solo per le cellule che si trovano nella fase G1. Infatti, studi preliminari hanno dimostrato che scaldando cellule nella fase S, quelle classificate con grado 1, 2 e 3, non sono riuscite a proliferare. Questo risultato è coerente col fatto che le cellule nella fase S sono più sensibili all'esposizione termica rispetto a quelle in fase G1, probabilmente perché nella fase S avviene la sintesi del DNA.

Gli autori di questo studio si sono posti il problema se i blebs rappresentano o meno un semplice aumento di volume e di superficie della cellula. Misurazioni eseguite subito dopo il trattamento con ipertermia hanno mostrato una riduzione del diametro delle cellule, arrivando anche, per i gradi più elevati, ad essere minore di quello dei blebs. Il volume perso dal corpo cellulare quindi è stato trasferito nel bleb.

Dal momento che il bleb rappresenta un aumento della superficie della membrana, gli autori avevano ipotizzato che ci fosse una diminuzione anche della densità delle particelle di membrana. Tuttavia, l'analisi con il "freeze fracture" ha dimostrato una certa uniformità nella densità sia nella cellula che nel bleb. Quindi, se il bleb non rappresenta un aumento di volume o di superficie, probabilmente rappresenta una ridistribuzione delle particelle.

Nonostante si sia visto che esiste una correlazione tra il blebbing indotto da ipertermia e il tasso di sopravvivenza delle cellule, questa non implica che le alterazioni della membrana siano il primo effetto del trattamento termico che porta alla morte cellulare. Si tratta quindi semplicemente di un cambiamento morfologico che accompagna altri cambiamenti nelle funzioni o nella morfologia cellulare.

5.4. Cambiamenti nella formazione dei blebs in seguito al trattamento ipertermico delle cellule CHO

Le cellule ovariche di criceto cinese sono state scaldate da 5 a 30 minuti a 41.5°C, 43.5°C e 45.5°C, e sono state determinati quantitativamente i micro e i macro blebs della membrana della cellula dopo una conservazione a 4°C (temperatura che causa il collasso della membrana dei blebs), 25°C (temperatura ambiente) e a 37°C.

La percentuale delle cellule che mostra il manifestarsi dei blebs dopo il trattamento a 45.5°C dipende dalla durata del riscaldamento, con un aumento dal 40% per 5 minuti al 90% per 30 minuti. Inoltre è stato osservato che per temperature minori, il fenomeno del blebbing è meno evidente, addirittura non quantificabile. Anche la temperatura a cui vengono poste le cellule dopo il trattamento influenza la formazione dei blebs: un lieve calo dei macro blebs a 25°C, un calo al 50% dopo 2 ore a 37°C e a meno del 10% dopo 1 ora a 4°C; i micro blebs aumentano lievemente a 37°C.

Tabella 9: cambiamenti nella formazione dei macro e micro bleb in base alla temperatura post-trattamento termico

| Temperatura post-ipertermia | Macroblebbing | Microblebbing |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 4°C | Calo al meno del 10% dopo 1h | <i>-dati non riportati-</i> |
| 25°C | Lieve calo | <i>-dati non riportati-</i> |
| 37°C | Calo del 50% dopo 2h | Lieve aumento |

Quando le cellule sono state trasferite rapidamente dai 4°C all'incubazione a 37°C, la percentuale di formazione dei blebs è tornata velocemente ai livelli più alti manifestati prima dell'incubazione alle basse temperature. [21]

6. Conclusioni

In questo elaborato sono stati raccolti alcuni studi presenti in letteratura scientifica riguardanti gli effetti che il calore ha sui mitocondri e la sua relazione con la comparsa di bleb sulla membrana cellulare. Gli studi riportati erano inerenti al trattamento in vitro di cellule mediante ipertermia applicato singolarmente e/o in combinazione con un'altra terapia di cura dei tumori, come l'irradiazione con i raggi-X o l'uso di farmaci chemioterapici.

Per quanto riguarda gli effetti del calore sui mitocondri, l'attenzione è stata focalizzata sulle proteine Bcl-2 e Bax, con la conclusione che quest'ultima proteina riveste un ruolo fondamentale nella mediazione della polarizzazione della membrana mitocondriale, con conseguente rilascio o meno di citocromo c nel citoplasma. In particolare è stata ricercata la funzione della Caspasi 2, constatando che essa regola la proteina Bax e che, se inibita, riduce l'esternalizzazione della fosfatidilserina e blocca la depolarizzazione del potenziale della membrana mitocondriale.

Infine, si è visto che esiste una relazione diretta tra il grado di blebbing sulla superficie cellulare e il tasso di mortalità, e la dimensione dei blebs dipende dalla durata del trattamento di ipertermia e della temperatura di trattamento. Inoltre, perché i blebs si staccino dalla cellula una volta riportata a temperatura ambiente, è stato ipotizzato che la cellula necessiti di ulteriore energia.

7. Bibliografia

- [1] <http://www.imbio.it/terapie/ipertermia.html>
- [2] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, *The cellular and molecular basis of hyperthermia*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 43, 2002.
- [3] http://www.reteoncologicaumbria.org/component/option,com_docman/Itemid,41/task,doc_view/gid,219/
- [4] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, *The cellular and molecular basis of hyperthermia*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 43, 2002.
- [5] *Kit e prodotti per lo studio dell'apoptosi* di Silvia Guenzi
- [6] *Terapia oncologica*. Luigi Frati – Antonia Notario
- [7] J Biol Chem. 2006 Feb 24; *Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity*. Patel VA, Longacre A, Hsiao K, Fan H, Meng F, Mitchell JE, Rauch J, Ucker DS, Levine JS.
- [8] Stefani, Taddei, *Percorsi di biochimica*, Zanichelli, 2011.
- [9] Lubert Stryer, *Biochimica*, Zanichelli, 1996
- [10] <http://www.reading.ac.uk/nitricoxide/intro/apoptosis/mito.htm>
- [11] http://www.lifesci.dundee.ac.uk/services/flow_cytometry/ca/cell-death
- [12] <http://www.treccani.it>
- [13] Nijhuis, Erwin, *Hyperthermia-induced apoptosis*. PhD thesis University of Twente, Enschede, The Netherlands
- [14] *Induction of apoptosis by heat and X-radiation in a human lymphoid cell line; role of mitochondrial changes and caspase activation*
- [15] *Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization after heat treatment is caspase-2 dependent*
- [16] Int J Cancer. 2003 Jan 1;103(1):53-60. *An association of Bcl-2 phosphorylation and Bax localization with their functions after hyperthermia and paclitaxel treatment*. Salah-Eldin AE, Inoue S, Tsukamoto S, Aoi H, Tsuda M.
- [17] *Reversal of TNF- α resistance by hyperthermia: Role of mitochondria*. Samuel Ko, W.F. Yuen, K.P. Fung, C.Y. Lee, Y.M. Choy, H.K. Cheng, T.T. Kwok, S.K. Kong

- [18] Arthur Cole and Elwood P. Armour (1988) *Ultrastructural Study of Mitochondrial Damage in CHO Cells Exposed to Hyperthermia*. Radiation Research: September 1988, Vol. 115, No. 3, pp. 421-435.
- [19] *Cell Blebbing and Membrane Area Homeostasis in Spreading and Retracting Cells*. Leann L. Norman,[†] Jan Bruges,[‡] Kheya Sengupta,[§] Pierre Sens,[‡] and Helim Aranda-Espinoza^{†*}
- [20] *A direct correlation between hyperthermia-induced membrane blebbing and survival in synchronous G₁ CHO cells*. M. J. Borrelli^{*}, R. S. L. Wong, W. C. Dewey
- [21] Bjelakovic, G., Nagorni, A., Bjelakovic, M., Stamenkovic, I., Arsic, R., & Katic, V. (2005). *Apoptosis: Programmed cell death and its clinical implications*. Medicine and Biology. 12(1), 6-11
- [22] *Life and Times of a Cellular Bleb*. Guillaume T. Charras,^{*} Margaret Coughlin,^{*} Timothy J. Mitchison,^{*} and L. Mahadevan^{*}
- [23] Maria Kapiszewska and Larry E. Hopwood (1986) *Changes in Bleb Formation Following Hyperthermia Treatment of Chinese Hamster Ovary Cells*. Radiation Research: March 1986, Vol. 105, No. 3, pp. 405-412.
- [24] *Contributi della tecnica del freeze-fracturing allo studio delle membrane biologiche*. G. Arancia. Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto superiore di Sanità, Roma