



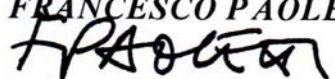
**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE**

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI (sede consorziata)**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE BIOMEDICHE**  
**SEZIONE DI PATOLOGIA SPERIMENTALE**

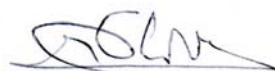
**DOTTORATO DI RICERCA IN:**  
**Oncologia Sperimentale e Clinica**  
**XXI CICLO**

**Alterazioni del metabolismo del colesterolo durante  
la genesi e la progressione di due patologie  
proliferative: Pterigio e Leucemia**

**TESI PRESENTATA DA:**  
**CLAUDIA MULAS**

**TUTOR:**  
**Prof. FRANCESCO PAOLETTI**  


**COORDINATORE DEL CICLO:**  
**Prof. MASSIMO OLIVOTTO**



**ANNI ACCADEMICI 2006-2009**

“ La chiave di tutte le scienze è senza dubbio  
il punto di domanda”.

(Honorè de Balzac)

## INDICE

<i>Abbreviazioni utilizzate nel testo</i>	<i>pag</i>	1
<b><i>Parte Generale:</i></b>	<i>pag</i>	3
<i>Il metabolismo del colesterolo</i>		3
<i>Il metabolismo del colesterolo durante la proliferazione cellulare</i>		21
<i>La membrana cellulare:Rafts lipidiche e caveole</i>		28
<i>Farmaci inibitori della crescita cellulare e dell'esterificazione del colesterolo</i>		38
<i>Scopo del lavoro</i>		40
<b><i>Generalità sullo pterigio</i></b>	<i>pag</i>	45
<i>Epidemiologia</i>		46
<i>Fattori di rischio</i>		47
<i>Quadri clinici e classificazione</i>		51
<i>Anatomia clinica</i>		55
<i>Sintomatologia</i>		59
<i>Eziologia</i>		61
<b><i>Materiali e Metodi</i></b>	<i>pag</i>	69
<i>Selezione dei pazienti</i>		69
<i>Isolamento dei fibroblasti</i>		70

<i>Immunoistochimica: espressione dei markers di proliferazione cellulare (proteine p53 e Ki-67)</i>	<i>pag</i>	73
<i>Saggi analitici</i>		75
<i>Conta cellulare al microscopio</i>		75
<i>Colorazione lipidica cellulare</i>		76
<i>Metodo di lowry</i>		77
<i>Marcatori radioattivi</i>		77
<i>Efflusso del colesterolo</i>		80
<i>PCR</i>		81
<i>Western Blotting</i>		84
<i>Attività proliferativa nei tessuti di pterigio e congiuntiva sana</i>		87
<i>Accumulo di lipidi in fibroblasti di pterigio</i>		89
<i>Esterificazione ed efflusso del colesterolo nei fibroblasti</i>		91
<i>Effetti dei farmaci antiproliferativi sui fibroblasti di pterigio</i>		93
<i>I farmaci antiproliferativi riducono la velocità di crescita dei fibroblasti di pterigio modulando l'omeostasi del colesterolo</i>		99
<b><i>Risultati</i></b>	<i>pag</i>	101
<b><i>Discussioni</i></b>	<i>pag</i>	111
<b><i>Generalità sulle Leucemie</i></b>	<i>pag</i>	117

<i>Leucemie Acute</i>		119
<i>Leucemie croniche</i>		125
<b><i>Materiali e Metodi</i></b>	<i>pag</i>	132
<i>Selezione dei pazienti</i>		132
<i>Condizioni di coltura</i>		133
<i>Test dei lipidi</i>		133
<i>Contenuto intracellulare dei lipidi</i>		134
<i>Colorazione dei lipidi</i>		134
<i>Incorporazione di [3H] thimidina nel DNA</i>		134
<i>Saggio per l'accumulo di Vinblastina</i>		135
<i>Esterificazione del colesterolo</i>		135
<i>PCR</i>		136
<i>Western - Blotting</i>		139
<b><i>Risultati</i></b>	<i>pag</i>	141
<b><i>Discussioni</i></b>	<i>pag</i>	154
<b><i>Conclusioni e prospettive future</i></b>	<i>pag</i>	158
<b><i>Bibliografia</i></b>	<i>pag</i>	160

## **Abbreviazioni utilizzate nel testo**

ABCA1, ATP binding cassette-A1

ACAT, acetyl-CoA transferasi

ALL, Leucemia linfocitica acuta

BSA, Bovine Serum Albumin

CD3, Cluster of Differentiation 3

CLL, leucemia linfocitica cronica

CoA, Coenzyme A

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

EGF, epidermal growth factor

EVE, Everolimus

FCS, Fetal Calf Serum

HB-EGF, Heparin-binding EGF-like growth factor

HDL, High-density lipoproteins

HMGCoA-R, 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase

HPVs, Human papillomavirus

IgE, immunoglobulin E

IgG, immunoglobulin G

LAM, Leucemie Acute Mieloidi

LCAT, Lecithin Cholesterol Acyltransferase

LCF, Leucemia a cellule filamentose

LDL-R, Low density lipoprotein receptor

LMC, Leucemia Mieloide Cronica

MDR1, multidrug resistance 1 gene

NCFs, Normal conjunctival fibroblasts,

PBS, phosphate-buffered saline solution

PFs, Pterygium fibroblasts

PG, Progesterone

Pgp, P- glycoprotein

PIO, Pioglitazone

PVDF, Polyvinylidene Fluoride

SaH, Sandoz 58-035

SSC, trisodium citrate sodium chloride

TBST, Tris-Buffered Saline Tween- 20

TCA, Trichloroacetic Acids

TCL, Thin Layer Chromatography

UV, Ultraviolet light

VLDL, Very low Density lipoproteins

## ***Parte Generale***

### *Il metabolismo del colesterolo*

Il colesterolo è una molecola fondamentale per la struttura e la funzione di tutte le cellule dei mammiferi, esso infatti, oltre a essere il precursore per la sintesi di ormoni steroidei, acidi biliari e vitamine essenziali, è un costituente strutturale di tutte le membrane cellulari dove ha il compito di regolarne la permeabilità e la fluidità. Un continuo apporto dello sterolo deve quindi essere costantemente assicurato, per il normale turnover delle membrane, a tutte le cellule dei tessuti dell'organismo. La cellula è in grado di procurarsi il colesterolo attraverso due vie principali:

- la sintesi endogena a partire dall'acetil-coenzima A
- l'acquisizione di colesterolo esogeno, attraverso l'internalizzazione di lipoproteine a bassa densità (LDL).

La cellula non possiede sistemi enzimatici che consentono la degradazione del colesterolo libero, per cui per evitare un aumento del suo contenuto, potenzialmente dannoso in quanto potrebbe comprometterne l'integrità, ricorre a due meccanismi principali:

- Il trasporto al reticolo endoplasmatico (RE) e la sua esterificazione ad opera dell'acil-coenzima A-colesterolo: aciltransferasi (ACAT).



- la cessione ad accettori esterni rappresentati soprattutto dalle lipoproteine ad alta densità (HDL).

### *Sintesi endogena colesterolo*

Il precursore della sintesi endogena del colesterolo è l'acetil-CoA, dal quale, attraverso una serie di reazioni biochimiche schematizzate in figura 1, si produce colesterolo. L'enzima chiave della via biosintetica del colesterolo è l'idrossimetil-glutaril-coenzimaA-reduttasi (HMG-CoA-r) che catalizza la trasformazione di HMG-CoA ad acido mevalonico e sul quale viene esercitata una fine regolazione a feed-back.

Attraverso questa via metabolica sono prodotti, oltre al colesterolo, altri composti non sterolici (dolicholo, ubiquinone e eme A) e unità isoprenoidi a 15 (farnesil) e a 20 (geranil) atomi di carbonio. Questi residui sono particolarmente importanti in quanto fondamentali per il funzionamento di proteine regolatrici leganti il GTP. Il legame di queste con residui farnesilici e geranilici, noto come "prenilazione delle proteine", ne permette l'ancoraggio alla membrana determinando quelle modificazioni necessarie per la loro attivazione (Zhang & Casey, 1996; Casey & Seabra, 1996. E' attraverso questo meccanismo che le p21 ras sono attivate, e sono in grado di avviare la trasduzione del segnale proliferativo (Casey et al., 1989).

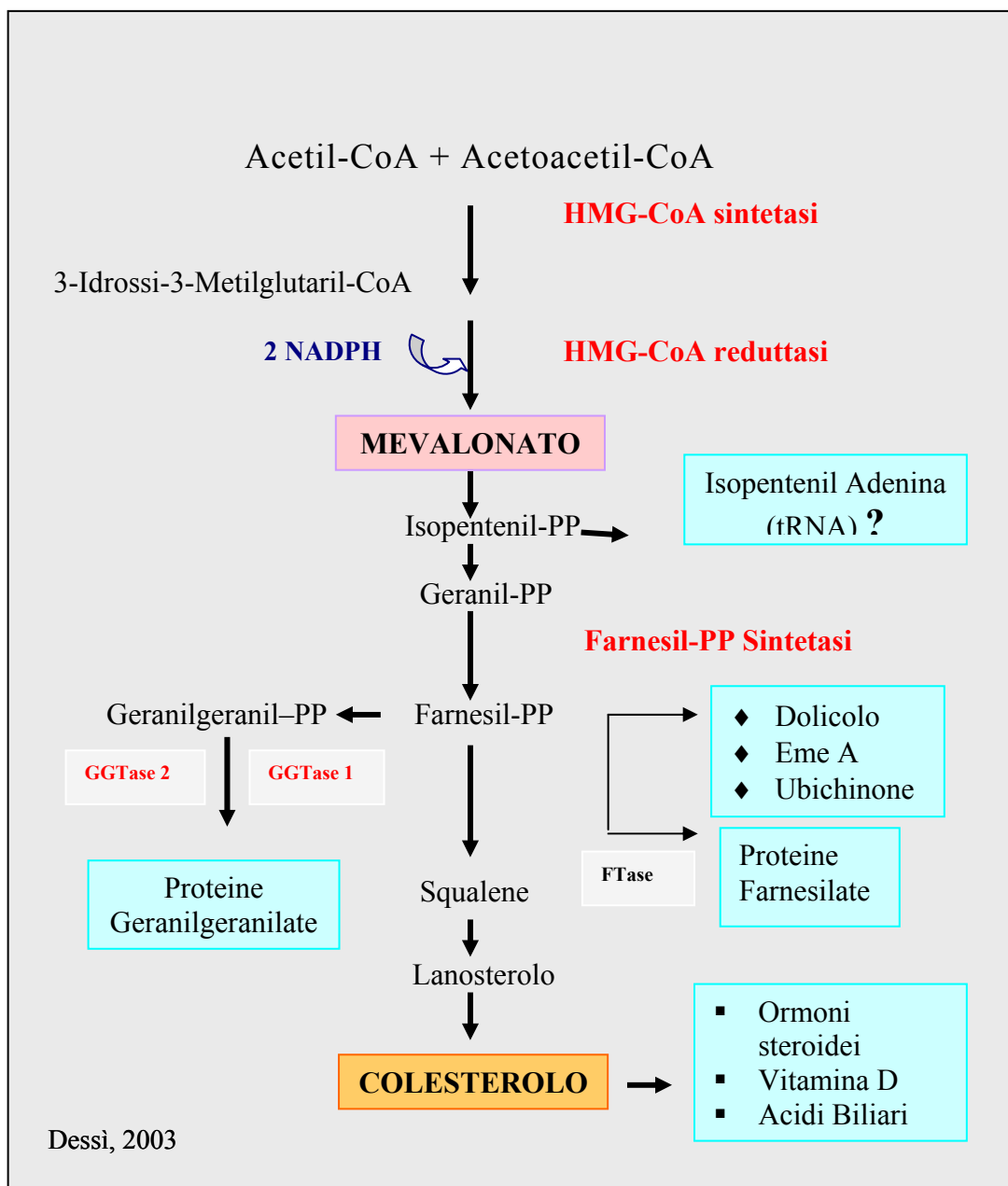
E' da segnalare che la via biosintetica del colesterolo richiede l'apporto di almeno 2 molecole di NADPH, che come è noto, è prodotto prevalentemente

dalla via dello shunt dei pentoso fosfati, il cui enzima chiave è la glucosio-6-fostato deidrogenasi (G6PD). La mancata disponibilità di NADPH rappresenta un fattore limitante la produzione di colesterolo.

Le reazioni che portano alla formazione del colesterolo avvengono inizialmente nel citoplasma e successivamente nel reticolo endoplasmatico (RE). Da qui la maggior parte del colesterolo raggiunge la membrana plasmatica. Recenti studi indicano che questo colesterolo arriva inizialmente in zone di membrana denominate caveole (Fielding & Fielding, 1995; 1996). Si tratta di invaginazioni di membrana ricche in colesterolo e sfingolipidi caratterizzate dalla presenza di una proteina di 22 kD: la caveolina 1 (Anderson, 1998; Kurzchalia & Parton, 1999). Si ritiene che questa proteina sia anche responsabile del trasporto del colesterolo dal RE alle caveole, da cui poi viene trasferito nelle zone non caveolari della membrana (Smart et al., 1996; Uittenbogard et al., 1998).

La sintesi del colesterolo può avvenire in tutti i tessuti ma è attiva soprattutto nei tessuti steroideogenici (surrene e ghiandole sessuali) che necessitano di colesterolo per la produzione di ormoni steroidei, e nel fegato dove viene utilizzato per la sintesi di lipoproteine e acidi biliari. Normalmente è proprio questo organo che provvede a rifornire di colesterolo i tessuti periferici. Non essendo solubile in soluzioni acquose il colesterolo viene trasportato in circolo dalle LDL e quindi ceduto ai tessuti

periferici attraverso un meccanismo recettoriale descritto per la prima volta da Goldstein e Brown (1977).



Dessi, 2003

### Figura I-1. Sintesi del colesterolo.

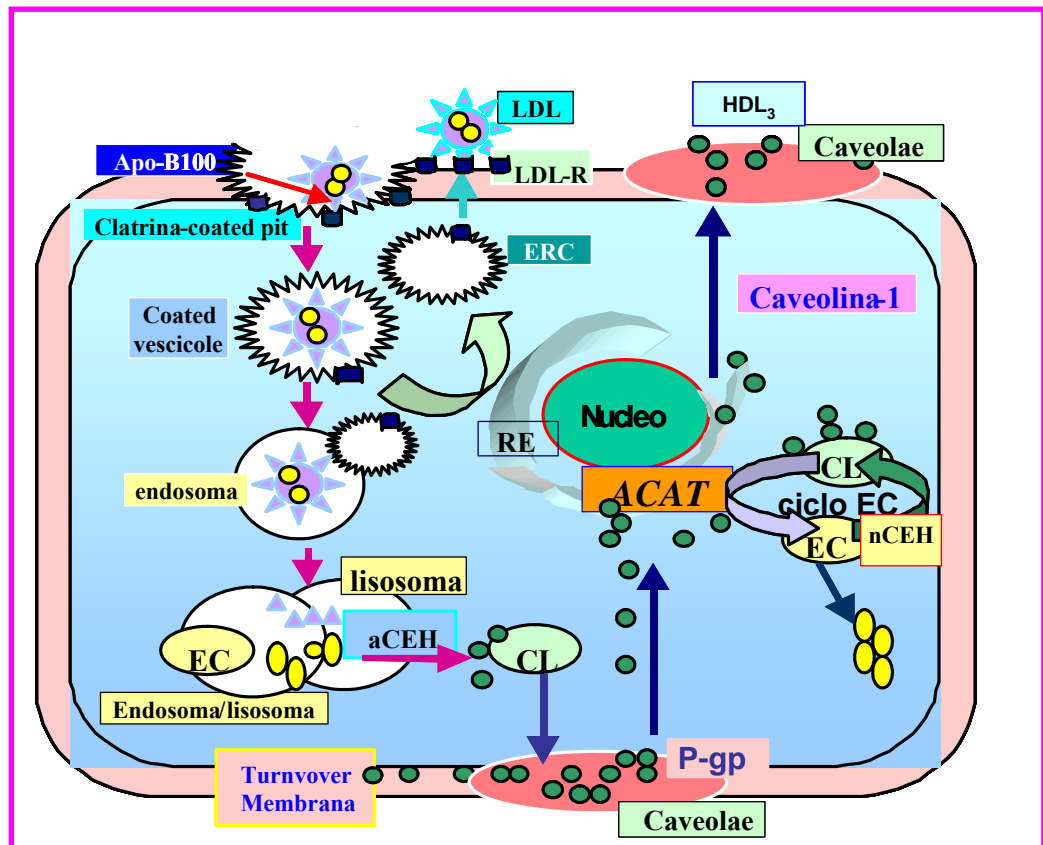
- Due molecole di acetil-CoA si condensano formando acetoacetil- CoA.
- Una terza molecola di acetil-CoA con una di acetoacetil- CoA sono convertite dall'HMG-CoA sintetasi in HMG-CoA.
- HMG-CoA è convertito a mevalonato dall' HMG-CoA reductasi.
- Tre fosforilazioni del mevalonato producono 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato che successivamente per decarbossilazione ATP dipendente porta a isopentenil-pirofosfato(PP), da cui poi si genera geranyl-pirofosfato(PP).
- Un geranyl-PP condensa con un isopentenil-PP per formare farnesil-PP.
- La squalene sintetasi catalizza la condensazione di due farnesil-PP a squalene.
- Attraverso 2 passaggi di ciclizzazione lo squalene è trasformato in lanosterolo.
- Per finire una serie di reazioni addizionali portano alla formazione di colesterolo.
- Farnesil-PP è anche un substrato per altri metaboliti cellulari (dolicolo, eme A ect) e per la prenilazione delle proteine. FTase= farnesiltransferasi, GGTase 1 e 2= geranylgeraniltransferasi.

### *Uptake del colesterolo esogeno.*

L'approvvigionamento di colesterolo da parte dei tessuti periferici avviene, come precedentemente accennato, principalmente dall'internalizzazione di LDL attraverso un meccanismo recettore mediato. Le LDL sono costituite da una parte centrale, composta soprattutto da esteri del colesterolo e, in minor misura, da trigliceridi e da un mantello esterno costituito da fosfolipidi, colesterolo libero e apoproteina B-100 (ApoB-100). Le LDL del siero sono captate dalle cellule previo legame con il recettore specifico (LDL-R), una glicoproteina transmembrana, che riconosce l' ApoB-100. Dopo il legame delle LDL con il proprio recettore localizzato in depressioni di membrana caratterizzate dalla presenza di clatrina, le fossette si invaginano formando delle vescicole endocitotiche che trasportano all'interno della cellula il complesso recettore-LDL. Il rivestimento di clatrina viene quindi rimosso e la vescicola non rivestita si fonde con gli endosomi. Qui, a causa dell'abbassamento del pH, i recettori si staccano dalle LDL e ritornano alla superficie cellulare.

All'interno dei lisosomi la lipoproteina è scissa nelle sue componenti per azione degli enzimi acidi lisosomiali. Il colesterolo che si libera dall'idrolisi degli esteri del colesterolo è immediatamente trasportato alle caveole presenti nella superficie delle membrane e da qui utilizzato per la sintesi di nuove membrane o per il normale "turnover" o se in eccesso trasportato al reticolo endoplasmatico per essere esterificato o ceduto alle

HDL. La captazione del colesterolo esogeno è descritto in fig. 2.



Dessi & Batetta 2003 (a)

### Figura I-2. Captazione del colesterolo esogeno: via recettore-LDL.

- La prima tappa nell'acquisizione delle LDL è il loro legame con il recettore (LDL-R) localizzato sulla superficie di invaginazioni della membrana rivestite di clatrina: "coated pits".
- Il complesso LDL e recettore viene quindi raccolto nelle "coated pits" e internalizzato a formare le vescicole rivestite: coated vescicole.
- La clatrina viene quindi rimossa e le vescicole non rivestite vanno a formare l'endosoma. Qui la pompa protonica ATP dipendente abbassa il pH causando la separazione delle LDL dal recettore. Si formano quindi due vescicole più piccole, una contenente le LDL e l'altra i recettori (compartimento endocitotico di riciclaggio: ERC). L'ERC si fonde alla plasmamembrana ritornando alla posizione iniziale.
- L'endosoma si fonde con il lisosoma formando l'endosoma/lisosoma. Qui le LDL vengono scisse nelle loro componenti per azione degli enzimi (proteasi e lipasi). Le apoproteine vengono idrolizzate a aminoacidi e gli esteri del colesterolo (EC) da una specifica idrolasi acida (aCHE) a acidi grassi e colesterolo libero (CL).
- La maggior parte di questo colesterolo che si libera (CL) dai lisosomi si localizza sulla superficie delle caveole da dove può essere usato dalla cellula (turnover o neogenesi delle membrane), essere trasportato al reticolo endoplasmatico per essere esterificato o essere ceduto alle HDL.

### *Acil-coenzimaA-colesterolo:aciltransferasi (ACAT)*

L'ACAT è l'enzima che catalizza la formazione intracellulare di esteri del colesterolo a partire da acidi grassi a lunga catena e colesterolo libero. Localizzata nelle membrane del RE richiede per la sua attività la presenza di ATP. Oltre al ruolo di detossificazione delle cellule dal colesterolo, si ritiene che gli esteri del colesterolo abbiano un significato fisiologico perché, essendo la forma con cui questo viene immagazzinato all'interno delle cellule, rappresenta un pool di colesterolo prontamente disponibile per le necessità cellulari (Chang et al., 1997). Tale pool subisce continue idrolisi e riesterificazioni in un ciclo apparentemente futile, denominato "ciclo degli esteri del colesterolo" (Brown et al., 1980).

L'enzima responsabile della fase idrolitica del ciclo degli esteri è un idrolasi neutra (nCEH) localizzata nel citoplasma in prossimità della faccia esterna della membrana del RE. L'attività dell'ACAT è regolata dai livelli di colesterolo libero presente nel reticolo endoplasmatico. Quando, infatti, il colesterolo nel RE aumenta al di sopra di un valore soglia si osserva l'incremento della sintesi degli esteri del colesterolo con conseguente loro accumulo nel citoplasma sotto forma di goccioline lipidiche.

Nonostante questo enzima sia presente in tutti i tessuti un accumulo di esteri del colesterolo si ritrova in condizioni "normali" solo nei tessuti che secernono



lipoproteine, come il fegato e l'intestino, o in quelli che utilizzano colesterolo come substrato per la produzione di ormoni steroidei (Pape et al., 1995).

Normalmente infatti per far sì che all'interno della cellula la quantità di colesterolo si mantenga entro livelli ottimali, l'uptake, la sintesi endogena e l'esterificazione del colesterolo, sono regolati in maniera coordinata mediante una serie di risposte complesse note come meccanismi omeostatici del colesterolo. Sembra che tutte le proteine implicate nell'omeostasi del colesterolo siano orchestrate da un comune segnale regolatore: il livello di colesterolo nel RE.

### *Sistema regolatorio degli steroli nel RE*

L'espressione dei geni per i recettori LDL, HMGC<sub>o</sub>A-sintetasi, HMGC<sub>o</sub>A- reduttasi e altri regolatori della quantità di colesterolo come la farnesil difosfato sintetasi e la squalene sintetasi, sono sotto il controllo di una famiglia di proteine legate alla membrana del RE chiamate "sterol regulatory element-binding proteins" (SREBP). Esse attivano i geni coinvolti nella sintesi del colesterolo e nel suo uptake comportandosi come fattori di trascrizione dopo scissione proteolitica (Brown & Goldstein, 1999). Questa scissione è regolata da un'altra proteina di membrana chiamata SCAP, cioè proteina attivante la scissione delle SREBP e serve come sensore degli steroli, in quanto blocca la sua attività quando il contenuto di steroli nel reticolo endoplasmatico supera un valore soglia. Bassi livelli di colesterolo al contrario porterebbero a una attivazione di SCAP e a un aumento del clivaggio proteolitico di SREBP con liberazione di un frammento di 68 Kda trascrizionalmente attivo. Tale frammento infatti entra nel nucleo e si lega a specifiche sequenze di DNA, prevalentemente i geni dell'HMGC<sub>o</sub>A-r e del recettore-LDL, e ne attiva l'espressione (Edwards e Ericsson, 1999).

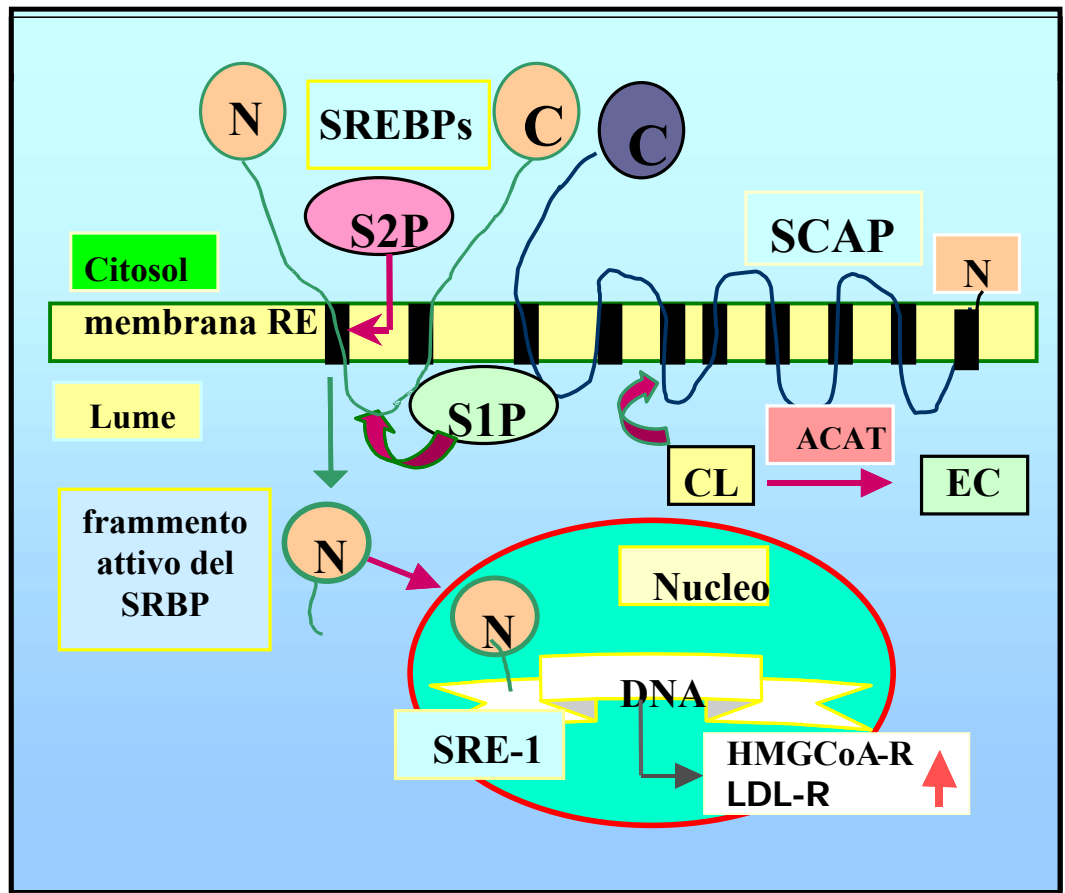
In figura 3 è riportata la sequenza degli eventi molecolari che portano all'attivazione di SREBP.

In sintesi, quindi il pool di colesterolo nel RE controllerebbe:

- ✓ la produzione di colesterolo attraverso la sintesi del HMG-CoA-reduttasi;
- ✓ l'ingresso di colesterolo esogeno attraverso la sintesi del recettore per LDL;
- ✓ l'attività dell'ACAT.

Poiché nella cellula la distribuzione del colesterolo è estremamente compartimentalizzata, con la maggior parte del colesterolo (70-90% del colesterolo totale cellulare) concentrato nelle membrane plasmatiche, è plausibile che quello in eccedenza rispetto alle necessità cellulari venga rapidamente trasportato dalla membrana al RE dove sono localizzate le proteine che regolano l'omeostasi.

Nonostante il trasporto del colesterolo dalla plasmamembrana al RE sembri rappresentare un punto cruciale nell'omeostasi del colesterolo, non è ancora chiaro attraverso quali meccanismi avvenga e come sia regolato. Alcuni studi (Debry et al., 1997; Metherall et al., 1996; Luker et al., 1999) indicano implicata in questo trasporto la P-glicoproteina MDR1 (P-gp).



Dessi & Batetta 2003 (a)

### Figura I-3. Sequenza della scissione proteolitica di SREBP

- I precursori delle “sterol regulatory binding protein” (SREBP) sono proteine integrali della membrana del reticolo endoplasmatico (RE); qui interagiscono con un'altra proteina la SCAP. Il segmento N-terminale del precursore delle SREBP contiene il dominio necessario alle SRE per attivare la trascrizione; questo segmento è trattenuto dall'entrare nel nucleo da un segmento-ancora formato da due sequenze transmembrana e un corto segmento a cappio nel lume del RE.
- Quando il livello del colesterolo nel lume del RE scende al di sotto di una certa soglia, il precursore delle SREBP subisce due scissioni proteolitiche sequenziali. La prima scissione avviene all'interno del lume del RE, producendo un intermedio che contiene il segmento di riconoscimento del SRE, ma rimane attaccato al RE attraverso il primo dominio transmembrana. Questa scissione, operata dalla proteasi denominata Sito-1 proteasi (S1P), è sensibile ai livelli di colesterolo nel RE. Questa funzione di sensore coinvolto nello stadio di scissione del SP1 è attribuita alla SCAP. Una seconda scissione avviene all'interno del primo dominio transmembrana, attraverso la Sito-2 proteasi (S2P), determinando il rilascio delle SREBP mature dalla membrana.
- Dopo la seconda scissione le SRBP mature (frammenti attivi) lasciano la membrana del RE e entrano nel nucleo, dove attivano i geni target che controllano la sintesi e l'uptake del colesterolo.

### *Coinvolgimento della P-glicoproteina MDR 1 nel trasporto del colesterolo*

La P-gp MDR1 (170 kDa) appartiene alla superfamiglia delle “ATP binding cassette” (ABC) proteine. E' formata da due metà omologhe unite da una regione flessibile di collegamento, ognuna contenente sei domini transmembrana e un dominio per il legame e l'utilizzazione dell'ATP, indispensabile quest'ultimo per l'adeguato funzionamento della P-gp.

Questa proteina, codificata dal gene MDR1 è stata originariamente identificata perché ritenuta la responsabile del fenomeno della resistenza multipla ai farmaci chemioterapici. Dal momento che la P-gp MDR1, oltre a essere sovraespressa in alcuni tumori in seguito a chemioterapia, è anche presente in molti tessuti normali (surrene, intestino ect. ), ci si è posti il problema di una sua possibile funzione fisiologica.

Diversi studi suggeriscono in aggiunta al ruolo nell'efflusso di diversi farmaci chemioterapici un suo coinvolgimento nel movimento del colesterolo dalla plasmamembrana al RE, sito dell'esterificazione del colesterolo ad opera dell'ACAT:

- ✓ Diversi agenti noti inibitori dell'attività come pompa di efflusso per i farmaci della P-gp MDR sono in grado di impedire il movimento del colesterolo dalla plasmamembrana al RE e quindi la sua l'esterificazione (Lange e Steck, 1994; 1997; Lange, 1994).

✓ L'inibizione del movimento del colesterolo dalle plasmamembrane al RE da parte di diversi ormoni steroidei è correlato alla capacità di ciascun steroide di prevenire l'azione della P-gp sull'efflusso dei farmaci (Debry et al., 1997).

Nonostante sia generalmente riconosciuto il coinvolgimento della P-gp nel trasporto e nell'esterificazione del colesterolo, ancora non si attribuisce a questa funzione alcun significato fisiologico.

### *Efflusso del colesterolo*

L'efflusso del colesterolo rappresenta per la maggior parte delle cellule l'unico meccanismo disponibile per la rimozione del colesterolo libero cellulare. Questo sistema noto come "trasporto inverso del colesterolo" (Glomset, 1968) è reso indispensabile dall'assenza nelle cellule di sistemi enzimatici deputati alla sua degradazione.

La classe lipoproteica responsabile del trasporto del colesterolo dai tessuti periferici al fegato per essere eliminato attraverso la bile è rappresentata dalle HDL. Si tratta di un gruppo eterogeneo di lipoproteine distinguibili a seconda dello stato di maturazione e della composizione in lipidi e proteine. Esse sono secrete dal fegato o dall'intestino tenue come particelle discoidali nascenti (HDLn), per lo più contenenti fosfolipidi e apoproteine A-1 (Apo-A1). In circolo le HDLn captano il colesterolo libero ceduto dai tessuti periferici o proveniente dal catabolismo dei chilomicroni e VLDL. Man mano che il colesterolo si trasferisce alle HDLn, viene trasformato ad opera dell'enzima plasmatico lecitin/colesterolo acil trasferasi (LCAT) in esteri del colesterolo, i quali, in virtù della loro idrofobicità si portano all'interno delle particelle HDL dando origine alle forme mature sferiche.

La captazione e il trasferimento del colesterolo dalle cellule alle HDL avviene tramite il loro legame con il recettore scavenger B tipo 1 (SR-B1) un membro della

superfamiglia di proteine CD36 presente sulla superficie cellulare (Krieger, 1999). I meccanismi dettagliati coinvolti in questo trasferimento rimangono per lo più sconosciuti. Diverse evidenze indicano che per uscire dalla cellula il colesterolo debba essere trasferito nelle caveolae, zone di membrana, la cui componente strutturale e funzionale principale è rappresentata dal colesterolo aggregato alla caveolina 1. Per quanto le caveole e la caveolina 1 non sono state ritrovate in tutte le cellule, siti analoghi (raft) a questi vengono descritti in molti tipi cellulari (Wu et al., 1997; Mirre et al., 1996).

Un'altra proteina di membrana che lega le HDL e media l'efflusso cellulare del colesterolo è la "cassetta" trasportatrice A 1 legante ATP (ABCA1) (Lawn et al., 1999).

E' interessante notare che l'SR-B1, il recettore ad alta affinità per le HDL, e ABCA1 sono probabilmente soprattutto concentrati nelle caveole (Graf et al., 1999; Mendez et al., 2001) in una posizione cioè tale da facilitare il trasferimento del colesterolo che arriva alle membrane dal RE alle HDL.





### *Il metabolismo del colesterolo durante la proliferazione cellulare*

I meccanismi che regolano e controllano il metabolismo del colesterolo sono molto complessi e garantiscono alla cellula la disponibilità del colesterolo di cui necessita e nello stesso tempo ne evitano l'eccesso.

Tale complessità garantisce che tale disponibilità venga costantemente adeguata e differenzialmente regolata in funzione delle esigenze metaboliche delle cellule.

La proliferazione cellulare è una condizione in cui le richieste cellulari dello sterolo aumentano notevolmente per sostenere la biogenesi delle nuove membrane.

L'aumento della sintesi endogena del colesterolo e della sua acquisizione via recettore LDL (Chait et al., 1979; Witte et al., 1982) è ampiamente descritto in letteratura in numerosi modelli sperimentali di proliferazione cellulare, condotti sia in vitro che in vivo (Siperstein et al., 1970; 1984; Chait et al., 1979; Witte et al., 1982).

Fino ai primi anni '80 tali modificazioni erano attribuite quasi esclusivamente alle aumentate richieste cellulari. Con l'avvento delle statine, molecole di provenienza fungina, attualmente di largo impiego nella terapia ipocolesterolemizzante, si scoprì che oltre il colesterolo, dall'acido mevalonico, venivano prodotte altre molecole non steroliche. Come è noto le statine agiscono inibendo l'attività dell'HMG-CoA-reduttasi, bloccando

quindi la formazione di acido mevalonico e impedendo le tappe successive della sintesi del colesterolo.

Il trattamento di cellule “in vitro” con tali molecole era accompagnato, oltre che dalla riduzione della sua sintesi, anche dall’inibizione della proliferazione cellulare, nonostante il colesterolo fosse presente nel terreno di coltura (Kandusch et al. 1977). Sorprendentemente l’inibizione della proliferazione era prevenuta se si aggiungeva acido mevalonico. Queste prime osservazioni sperimentali hanno suggerito che, dall’acido mevalonico (branched pathway) venissero prodotte molecole non steroliche che in qualche modo erano correlate alla proliferazione cellulare (Habenicht et al., 1980).

E’ successiva la scoperta di proteine (Schmidt et al., 1984) che si legano ai gruppi farnesilici e geranilici derivanti dall’acido mevalonico. Questi ultimi sono necessari per l’ancoraggio e l’attivazione di proteine come la p21 ras implicate nella trasduzione del segnale che porta all’attivazione del ciclo cellulare (Zhang & Casey, 1996). Tale scoperta ha aperto un nuovo filone di ricerca, tant’è che gli inibitori dell’HMG-CoA reduttasi, e oggi della farnesil transferasi, per il loro effetto inibitorio sulla proliferazione, sono molto studiati come possibile trattamento nella terapia antitumorale.

Se il mondo scientifico si è lanciato con entusiasmo nello studio del ruolo delle molecole derivanti dall’acido mevalonico, tali scoperte hanno anche decretato

l'avvento del medioevo per il colesterolo come molecola, relegato al ruolo di componente importante, essenzialmente per la struttura della membrana.

Per quanto siano stati trascurati, oltre alla biosintesi e all'uptake via R-LDL, anche l'esterificazione e l'efflusso del colesterolo sono meccanismi che contribuiscono a garantire l'apporto di colesterolo necessario durante la proliferazione cellulare.

Nel nostro laboratorio abbiamo studiato tale aspetto in vari modelli di proliferazione cellulare normale e neoplastica, in vivo e in vitro, e abbiamo verificato che l'aumento della sintesi ed uptake dello sterolo era sempre accompagnata anche dall'aumento della sua esterificazione e dalla riduzione della sua cessione alle HDL (nei modelli "in vivo") o al terreno di coltura in quelli "in vitro" (Dessi et al., 1989; 1990 a; 1991 a b; 1992 a b; 1994).

E' da rilevare che nelle cellule, con esclusione delle cellule epatiche, surrene e intestino, la percentuale di colesterolo presente nella forma esterificata è molto bassa (il 10% del totale). Tale percentuale aumenta notevolmente nei tessuti in proliferazione (tessuti embrionali e tumori) (Dessi et al., 1984, 1986; Clayman et al., 1986).

La drastica riduzione della cessione del colesterolo all'esterno suggerisce che l'aumento dell'esterificazione è conseguenza non solo dell'aumento dell'acquisizione e produzione di colesterolo ma anche di un metabolismo cellulare orientato alla conservazione.

Abbiamo osservato, nei modelli di proliferazione cellulare limitati nel tempo, che tali modificazioni accompagnavano il processo proliferativo e regredivano col regredire di questo per cui abbiamo suggerito che l'aumento dell'esterificazione potesse garantire una pronta disponibilità dello sterolo per supportare le aumentate richieste durante la proliferazione (Dessi et al., 1984).

Tale ipotesi è stata ulteriormente supportata dall'osservazione che la sintesi e l'accumulo degli esteri, e la riduzione dei livelli di colesterolo HDL fossero positivamente correlati alla velocità di crescita cellulare (Dessi et al., 1989; 1991 b; 1994; 1997). Per questo motivo nel nostro laboratorio abbiamo indirizzato le nostre attenzioni ai meccanismi che regolano la sintesi degli esteri del colesterolo.

Come precedentemente descritto l'esterificazione è regolata dalla quantità di colesterolo che dalle plasmamembrane arriva al RE, probabilmente attraverso l'intervento della P-glicoproteina MDR1.

Da studi da noi condotti su linee cellulari caratterizzate da velocità di crescita differenti è emerso che l'espressione del gene MDR1 è positivamente correlato all'espressione dell'ACAT, ai livelli di esterificazione del colesterolo e alla velocità di crescita (Batetta et al., 1999 b; Dessi et al., 1997).

Questi risultati suggeriscono che durante la proliferazione cellulare i meccanismi che intervengono nel regolare la sintesi e l'accumulo di esteri del colesterolo

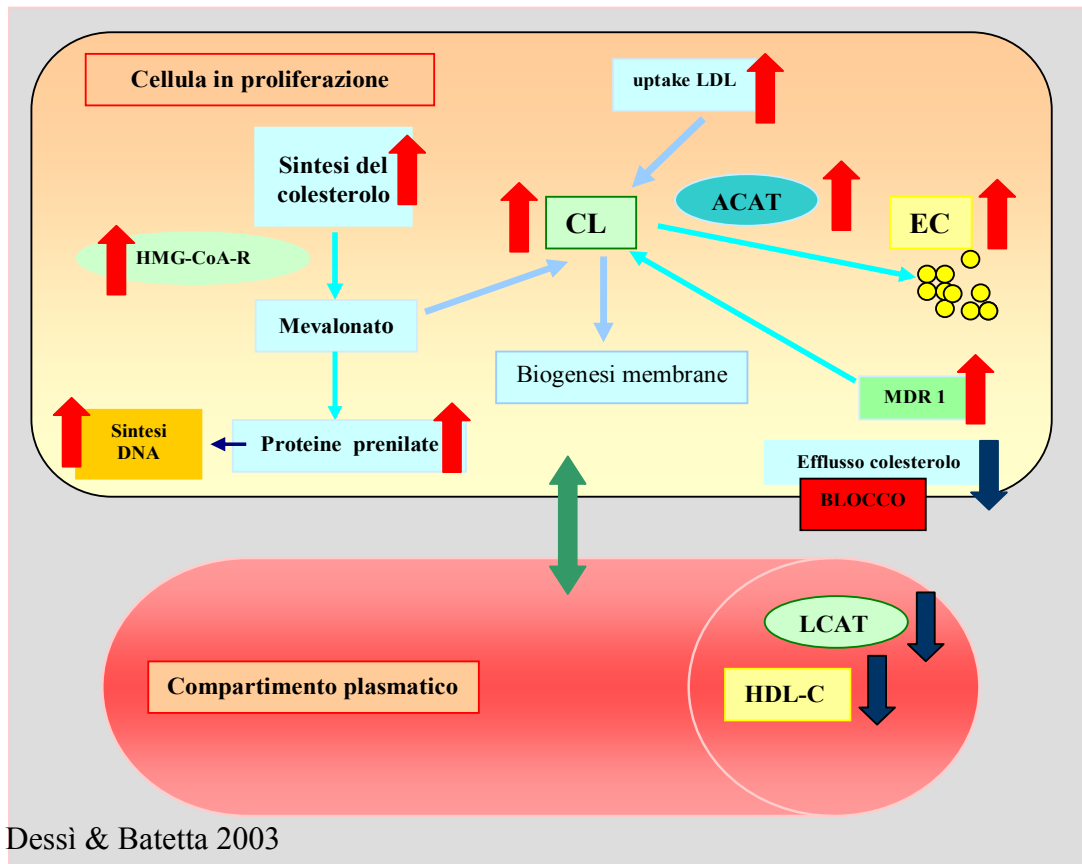
sono profondamente modificati. Queste considerazioni sono ulteriormente supportate dall'osservazione che il gene che codifica per la caveolina, la proteina shuttle che veicola il colesterolo dal RE alle plasmamembrane, riducendo quindi la quantità di colesterolo nella sede dell'esterificazione e contemporaneamente favorendone l'efflusso (Graf et al., 1999) ha un pattern di espressione opposto all'ACAT e al MDR1. Infatti studi da noi condotti su cellule muscolari lisce hanno evidenziato che l'attivazione alla proliferazione si accompagna all'aumento dell'espressione dei geni ACAT e MDR1 e alla diminuzione dell'espressione della caveolina 1 (Batetta et al., 2001).

Recentemente è stato anche suggerito che livelli di colesterolo nelle membrane aggregati con la caveolina 1, possano rappresentare un segnale negativo per la proliferazione cellulare.

Anche se non tutte le cellule posseggono la caveolina, quindi le caveole, è ormai largamente accettato che la trasduzione di numerosi segnali cellulari, tra i quali quello proliferativo, avvenga in larga misura in zone specializzate della plasmamembrana e che il contenuto di colesterolo, in tali zone, possa essere un importante fattore regolatore. E' stato infatti suggerito che bassi livelli di colesterolo siano associati ad attivazione delle molecole implicate nella trasduzione del segnale proliferativo mentre livelli più alti sono associati a inattivazione di questi (Fielding et al., 1999).

Nonostante l'importanza che si attribuisce al contenuto di colesterolo nelle membrane, ancora molto poco si conosce sui meccanismi che lo regolano.

Nel complesso questi dati ripropongono il colesterolo, oltre che come molecola strutturale, come possibile regolatore di funzioni cellulari importanti quali la trasduzione del segnale proliferativo.



**Figura I-5. Metabolismo del colesterolo durante la proliferazione cellulare**

- L'approvvigionamento del colesterolo durante la proliferazione è ottenuto dalla sintesi endogena e dall'uptake delle LDL.
- L'incremento della sintesi del colesterolo durante la proliferazione ha un duplice ruolo: (1) produzione di colesterolo libero (CL) da utilizzare per la biogenesi di nuove membrane; (2) produzione di proteine prenilate fondamentali per la trasduzione del segnale proliferativo.
- L'aumento del colesterolo libero all'interno della cellula induce l'esterificazione da parte dell'ACAT, con conseguente accumulo di esteri (EC).
- L'aumentata utilizzazione e conservazione del colesterolo sotto forma di esteri, nel tessuto proliferante si traduce nel compartimento plasmatico in un decremento del colesterolo legato alle HDL.

↑ = aumento      ↓ = riduzione



## ***La membrana cellulare: Rafts lipidiche e caveole***

### *Composizione delle rafts lipidiche*

Le rafts (“zattere”) lipidiche hanno trasformato il nostro modo di concepire l’organizzazione e la struttura della membrana cellulare. Le rafts sono delle piccole piattaforme, costituite da sfingolipidi e colesterolo nel foglietto esterno della membrana collegate con i sfingolipidi ed il colesterolo del foglietto citoplasmatico interno del doppio strato lipidico.

Questi assemblamenti sono fluidi, ma più ordinati e compatti tra loro rispetto al circostante doppio strato (Simons, K & Toomre 2000; London & Brown 2000).

La compattezza delle rafts è dovuta alla saturazione delle catene carboniliche degli sfingolipidi e dei fosfolipidi che le formano, rispetto agli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi (Kennedy, M. et al, 1997) presenti nelle aree non-rafts (fase fluida disordinata).

La presenza nelle cellule di questi microdomini fluidi e ordinati, trasforma il modello classico della membrana fluida di Singer e Nicholson in un sistema più complesso in cui le proteine e le rafts lipidiche diffondono lateralmente immerse in un liquido bi-dimensionale. Le proteine di membrana sono classificate in tre categorie: quelle che risiedono soprattutto nelle rafts, quelle che si trovano nella fase liquida disordinata (domini non -rafts), e quelle in uno stato intermedio, che si muovono dentro e fuori le rafts.

Nelle rafts sono comprese proteine ancorate al glicofosfatidilinositolo (glycophosphatidylinositol-anchored,

GPI-anchored proteins); proteine bi-acetilate, come la tirosin-chinasi della famiglia Src, la subunità Ga delle proteine G eterotrimeriche; la Nitrico-ossido-sintasi endoteliale

(endothelial nitric oxide synthase, eNoS); le proteine Hedgehog simili che si legano al colesterolo e al palmitato (Jeong, J & McMahon, 2002) ; infine, proteine transmembrana, in particolare quelle palmitoilate, come l'emoagglutinina del virus dell'influenza (Simons, K & Toomre 2000) e la  $\beta$ -secretasi (BACE) .

Alcune proteine risiedono nelle rafts in modo regolato e nel loro stato inattivo hanno una bassa affinità per esse. Nello stato attivo, invece, in seguito al legame con il loro ligando, vanno incontro a cambiamenti conformazionali e possono anche formare degli oligomeri. Quando queste proteine oligomerizzano aumentano la loro affinità per le rafts (Harder, T., Scheiffele, 1998).

### *Colesterolo e biogenesi delle rafts*

Nella membrana plasmatica, il colesterolo svolge la funzione di distanziare le catene carboniliche degli sfingolipidi e di colla dinamica che tiene insieme le rafts (Simons, K & Toomre 2000).

Il colesterolo, infatti, si distribuisce nella membrana in base alla sua maggiore affinità per gli sfingolipidi delle rafts piuttosto che per i fosfolipidi insaturi delle zone non rafts

La rimozione del colesterolo delle rafts provoca la dissociazione della maggior parte delle proteine ivi residenti e le rende incapaci di svolgere le proprie funzioni. Un sistema pratico per valutare se una proteina risiede all'interno delle rafts consiste nel valutarne l'associazione con le aree di membrana (London & Brown 2000) resistenti all'azione detergente (detergent-resistant membranes, DRMs).

Dopo aver solubilizzato le membrane cellulari con Triton X 100 o con CHAPS alla temperatura di 4°C, le proteine e i lipidi associati con le rafts rimangono insolubili e possono essere separati mediante centrifugazione in gradiente di sucroso a bassa densità. Inoltre, se il colesterolo viene estratto con la metil- $\beta$ -ciclodestrina o complessato con la saponina, le proteine rafts solitamente diventano solubili dopo l'azione detergente. Le rafts lipidiche si assemblano per prime nell'apparato del Golgi delle cellule di mammifero (Kennedy, M. et al, 1997). La sintesi del colesterolo avviene nel reticolo endoplasmatico (ER), così come quella della ceramide e della struttura centrale idrofobica degli sfingolipidi. Il legame della maggior parte degli

sfingolipidi alla ceramide avviene proprio nell'apparato del Golgi, dove si assemblano anche le rafts (Van Meer et al, 1989).

I lipidi che costituiscono le rafts sono poi trasferiti dal complesso del Golgi fino alla membrana plasmatica dove si concentrano ma da qui possono anche diffondere verso le vie endocitiche di riciclaggio (Mukherjee, S & Maxfield, 2000). Tuttavia, la cellula paga un prezzo per l'utilizzo del colesterolo come elemento che distanzia e nello stesso tempo mantiene insieme le rafts.

Il colesterolo, infatti, è tossico e la sua concentrazione all'interno della cellula è mantenuta sotto stretto controllo grazie ad una rete complessa di regolazioni trascrizionali della biosintesi e dell'uptake cellulare, come anche della formazione di depositi di colesterolo sotto forma di goccioline di grasso in forma esterificata e mediante efflusso cellulare (Simons, K & Toomre 2000; Tall et al 2002; Tabas, 2002). Dunque, la distribuzione in colesterolo e sfingolipidi cellulari all'interno della cellula è finemente regolata. Alterazioni in questi meccanismi di controllo possono provocare o aggravare una grande varietà di malattie legate al metabolismo lipidico.

### *Regolazione delle dimensioni delle Rafts*

Una caratteristica importante nella funzione della rafts è la loro dimensione. Le rafts sono troppo piccole per essere visibili al microscopio ottico (Pralle et al, 2000) Hanno utilizzato un microscopio a fotoni per misurare le dimensioni delle rafts lipidiche e hanno scoperto che, nei fibroblasti, esse diffondono nella membrana plasmatica come assemblamenti di 50nm di diametro, corrispondenti ad una superficie coperta da 3000 sfingolipidi.

I dati ottenuti da cellule in coltura isolate dal tessuto renale di una cavia neonata (BHK), la cui composizione in lipidi ed organelli era stata studiata in dettaglio, dimostrano che la superficie di una singola cellula equivale approssimativamente a  $2.000\mu\text{m}^2$ .

La composizione lipidica della membrana plasmatica cellulare, inoltre, era costituita per il 26% da fosfatidilcolina (Allan et al, 1996) dal 24% di sfingomieline e dal 12% di glicosfingolipidi. A causa della natura asimmetrica della loro distribuzione, la maggior parte degli sfingolipidi risiede nel foglietto esterno di membrana, mentre meno della metà è costituito dalla fosfatidilcolina. Dato che si suppone che la maggior parte degli sfingolipidi si trovi nelle rafts, queste ultime dovrebbero occupare più della metà della superficie di membrana. Inoltre, è stato stimato che la densità delle proteine di membrana è di circa 20.000 molecole per  $\mu\text{m}^2$ , quindi nella membrana sarebbero contenute in totale circa  $40 \times 10^6$  molecole proteiche.

Considerando questi numeri, il numero di rafts di dimensioni intorno ai 50nm sarebbe circa  $10^6$  e, di conseguenza, se la densità delle proteine fosse la stessa nelle rafts e nel circostante doppio foglietto, ciascuna raft dovrebbe contenere intorno a 20 molecole proteiche. Se le cellule BHK studiate sono realmente rappresentative, ne consegue che la densità delle rafts nella membrana plasmatica del fibroblasto è elevata.

Supponendo che le  $20 \times 10^6$  proteine raft si distribuiscono in modo più o meno casuale, ciascuna raft dovrebbe contenere un diverso subset di proteine.

Una chinasi ancorata al lato citosolico di una raft, quindi, difficilmente troverà il suo specifico substrato sulla stessa raft. Le ridotte dimensioni di ogni singola raft sarebbero dunque importanti per mantenere le proteine di segnale in esse contenute allo stato di “off”. Di conseguenza, per attivarle, molte rafts dovrebbero confluire insieme per formare una piattaforma più estesa, dove le proteine che partecipano alla trasduzione del segnale possono incontrarsi, rimanendo indisturbate rispetto a quanto accade al di fuori della piattaforma. ( vedi Fig.2 alla pagina seguente).

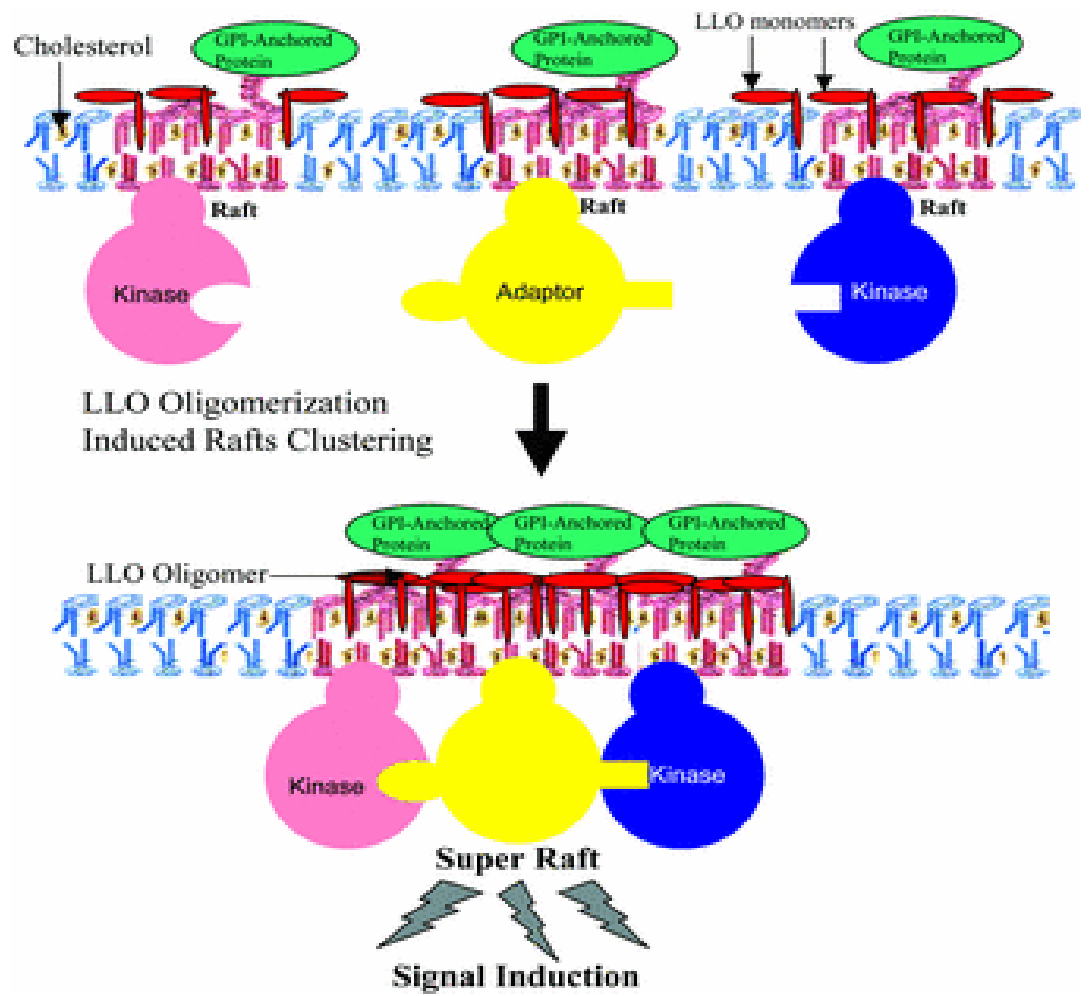


Fig 2: Meccanismo attraverso il quale le rafts si assemblano:

Le rafts (in rosso) normalmente hanno delle dimensioni ridotte a livello della membrana plasmatica, e contengono solo un piccolo subset di proteine.

Le dimensioni delle rafts aumentano in seguito a clusterizzazione, originando un nuovo assetto di molecole. Questa associazione può essere innescata (1) nella porzione extracellulare, mediante il legame di ligandi, anticorpi, o lecitine.(2) All'interno della membrana, mediante oligomerizzazione, o (3) mediante agenti citosolici (elementi del citoscheletro, molecole adattatrici, molecole scaffolds). L'assemblaggio delle rafts avviene nella membrana plasmatica ed anche a livello intracellulare, nel lumen endosomale. Il legame del ligando o l'oligomerizzazione può alterare la distribuzione delle proteine sia all'interno che fuori dalle rafts. L'aumento dell'affinità di una data proteina raft e la sua attivazione all'interno delle raft stesse può provocare una cascata di eventi che determinano l'aumento delle dimensioni della raft mediante clusterizzazione.

Normalmente, dunque, le rafts sono molto piccole, ma una volta attivate clusterizzano per formare delle piattaforme in cui delle proteine funzionalmente correlate possono interagire.

Un modo per analizzare come le rafts si associano e clusterizzano è quello di legare con anticorpi specifici i componenti raft e quelli non raft (Harder et al, 1998; Janes, Ley 2000.) Nelle membrane plasmatiche, quando due componenti raft si legano entrambi con i loro anticorpi specifici formano delle aree sovrapposte. Invece, la composizione di una proteina



raft con un marcatore non raft come il recettore per la transferrina determina la formazione di aree segregate.

E' evidente che la distribuzione di queste aree dipende dal colesterolo. Come conseguenza delle piccole dimensioni e della composizione eterogenea di ogni singola raft, queste strutture potrebbero clusterizzare in modo che ne risultino delle specifiche vie di segnale. Nella pratica clinica, un esempio di questo tipo di clusterizzazione delle raft è il segnale mediato dalle IgE durante la reazione allergica (Sheets, Holowka, 1999; Holowka et al, 2001) L'allergene che suscita la reazione allergica mediante degranulazione delle mast cellule o delle cellule basofile è multivalente, in quanto lega diverse molecole di recettori delle IgE.

Il cross-linking di due o più recettori IgE [Fc(E)RI] aumenta il loro grado di associazione con le rafts, come dimostra l'aumento della resistenza all'azione detergente. All'interno delle rafts, i recettori [Fc(E)RI] che sono andati incontro a legame, vengono fosforilati a livello di una tiroxina della proteina chinasi Lyn, correlata alle Src-chinasi biacetilate. La fosforilazione del frammento [Fc(E)RI] recluta delle chinasi correlate con la Syc, che una volta attivate innescano le sequenze di eventi che determinano la traduzione del segnale a valle da parte di altre molecole che entrano a far parte di una "struttura complessa" di segnale. In questa struttura è compresa la proteina raft LAT (clinker of activation of T cells), che controlla la clusterizzazione di ulteriori rafts all'interno di questa piattaforma in espansione (Rivera, Arudchandran, 2001).

La trasduzione del segnale determina la mobilitazione del calcio, che innesca la liberazione di mediatori preformati come per esempio l'istamina da parte dei depositi intracellulari. Quante più molecole coinvolte nella trasduzione si troveranno assemblate nella piattaforma della raft, più intensa sarà la risposta del segnale. Un'amplificazione incontrollata della cascata di segnale innescata dal confluire insieme di diverse rafts potrebbe provocare reazioni da iperattivazione potenzialmente fatali, quali l'edema di Quincke e lo shock allergico.

L'intera struttura per la trasduzione del segnale può essere disassemblata mediante defosforilazione o inibita mediante internalizzazione endocitica dei componenti coinvolti (Xu, Williams 1998). Dunque, nel signaling delle IgE, le rafts lipidiche svolgono la funzione di aumentare l'efficienza mediante la concentrazione delle proteine partecipanti in microdomini fluidi e limitandone la diffusione laterale. Anche un minimo cambiamento all'interno delle rafts può, mediante amplificazione, iniziare una cascata di segnale o indurre una pericolosa risposta incontrollata, come avviene nelle reazioni allergiche (Kholodenko, Hoek 2000).

## *Farmaci Inibitori della crescita cellulare e dell'esterificazione del colesterolo*

Gli inibitori della crescita cellulare e dell'esterificazione del colesterolo possono rappresentare un buon strumento per valutare le variazioni del metabolismo del colesterolo in rapporto ad alterazioni del tasso di crescita. Inoltre i farmaci inibitori della proliferazione cellulare potrebbero fornire benefici clinici in malattie proliferative, poiché hanno mostrato sia in vitro che in vivo un'attività antiproliferativa su un'ampia gamma di linee cellulari umane (Nashan, Review 2002; Eisen et al 2003).

Inibitori della proliferazione cellulare: *Pioglitazone ed Everolimus*. Inibitori dell'esterificazione del colesterolo: *Progesterone e Sandoz*

### *Pioglitazone*

I glitazoni sono una nuova classe di farmaci ipoglicemizzanti orali strutturalmente non correlati con gli antidiabetici classici; essi agiscono con un meccanismo d'azione diverso diminuendo nel diabete di tipo 2, l'insulinoresistenza nel tessuto adiposo, nel muscolo scheletrico e nel fegato.

I capostipite di questa classe è il troglitazone, ritirato volontariamente dalla ditta produttrice dopo solo due mesi dalla commercializzazione (1997) in Inghilterra, a causa della sua grave epatotossicità; negli USA si arrivò al ritiro solo nel 2000, nonostante i numerosi casi di gravi reazioni epatiche e cardiache (6 casi di morte già alla fine del 1997). Il Rosiglitazone e il Pioglitazone rappresentano le molecole di ultima generazione appartenenti a questa famiglia. E' importante sottolineare che

l'interesse per questi farmaci va oltre la loro applicazione antidiabetica in senso stretto infatti questi farmaci hanno dimostrato una notevole attività modulatoria sui processi immunitari ed infiammatori.

Il Pioglitazone è caratterizzato dalla presenza di un gruppo tiazolidinedione (TZD), che agisce come ligando dei PPARgamma. Il trattamento con i ligandi dei PPARgamma inibisce la produzione di molecole pro-infiammatorie quali TNF-alfa, IL-1beta e IL6 con un meccanismo che coinvolge l'interazione con fattori trascrizionali come NFkB, AP-1, e STAT-1.

#### *Everolimus o Rapamicina*

L'Everolimus (EVE) è un lattone macrociclico, che agisce come potente agente immunosoppressore poiché inibisce la proliferazione delle cellule T attivate dall'antigene. L'Everolimus inibisce i segnali di proliferazione trasmessi a seguito dell'intervento di IL2 e IL5, determinando l'arresto del ciclo cellulare in fase G1.

Rappresenta una nuova terapia aggiuntiva che ha un grosso vantaggio nei trapianti di cuore in quanto è stata dimostrata la sua capacità di ridurre le vasculopatie in molti pazienti trapiantati (Ikeda, SugiYama 2001; Schuler et al 1997).

#### *Sandoz 58-035 e Progesterone*

Inoltre, abbiamo studiato l'effetto degli inibitori di due diverse fasi dell'esterificazione del colesterolo: il Progesterone (PG) e il Sandoz 58-035 (SaH). Il primo, infatti, modula l'attività del gene MDR1 mentre il secondo svolge un'azione inibente sull'ACAT.

## ***Scopo del lavoro***

Lo scopo del lavoro di questa tesi è quello di studiare l'alterazione del metabolismo del colesterolo durante la genesi e la progressione di due patologie proliferative: una di natura benigna lo pterigio e l'altra di natura maligna la leucemia.

### ***Lo Pterigio***

Lo pterigio è una patologia che colpisce l'occhio e che, oltre ad alterare l'estetica della superficie del bulbo, negli stadi più avanzati, è potenzialmente in grado di causare cecità e richiede allora una complessa operazione chirurgica per la riabilitazione della vista. La patogenesi dello pterigio non è stata ancora chiarita, però sono state riscontrate delle caratteristiche che dimostrano quanto sia affine alle lesioni neoplastiche, come per esempio la displasia a livello istologico e l'invasività locale che suggeriscono entrambe un'eziologia tumorale (Chen, Tsai 1994; Dushku et al 1994). Inoltre, studi più recenti, che hanno esaminato l'espressione di alcuni fattori di crescita e della proteina P53 nello pterigio, suggeriscono che la congiuntiva va incontro a iperplasia epiteliale e proliferazione fibrovascolare che si estende fino alla cornea (Hirst 2003; Nolan et al 2003). Un dato comune, riscontrato sia nei tumori che nei tessuti proliferanti, è l'elevata attività del metabolismo del colesterolo, che include la sintesi del colesterolo, l'uptake e l'accumulo intracellulare di esteri del colesterolo (Clayton et al 1998; Dessi et al 1994).

Studi precedenti da noi condotti hanno dimostrato che, nello pterigio, rispetto alla congiuntiva normale, i livelli di mRNA dei recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDL-R)

e l'idrossimetil-glutaril Coenzima A reduttasi (HMGC<sub>o</sub>A-R), l'enzima regolatore della biosintesi del colesterolo, risultano più elevati (Mazzone, Bashheeruddin 1990; Peiretti, Dessi 2004).

Questi risultati, sebbene preliminari, indicano che alterazioni del metabolismo del colesterolo potrebbero interagire direttamente o indirettamente nella patogenesi della proliferazione che avviene nelle lesioni causate dallo pterigio.

Già in precedenza, è stato dimostrato che i fibroblasti di pterigio presentano una modalità di crescita differente rispetto a quella dei fibroblasti derivati dalla congiuntiva normale. I fibroblasti di pterigio, infatti, mostravano una ridotta dipendenza dal terreno di coltura e da fattori esogeni necessari per la crescita e raggiungevano una densità di saturazione che era triplice rispetto ai fibroblasti di congiuntiva normale coltivati nelle medesime condizioni ( Nolan, Di Girolamo 2004; Kria, Ohira 1998).

In questo studio abbiamo concentrato il nostro interesse sul metabolismo del colesterolo e l'espressione di alcune proteine coinvolte in esso, sulle caratteristiche della crescita, utilizzando come modello i fibroblasti di congiuntiva sana (NCFs) e fibroblasti di pterigio (PFs) in colture primarie.

Inoltre, abbiamo valutato gli effetti di alcuni farmaci antiproliferativi (Everolimus e Pioglitazone) e che agiscono sul metabolismo del colesterolo (Progesterone e Sandoz 58- 035) in fibroblasti di pterigio proliferanti. Il nostro obiettivo è stato quello di monitorarne gli effetti al fine di determinare se il loro utilizzo possa inibire la proliferazione cellulare e quindi prevenire le recidive dello pterigio.

Chiaramente sarebbero necessarie ulteriori ricerche per definire l'importanza fisiologica delle funzioni aggiuntive della Pgp e del gene MDR1.

Infatti, abbiamo dimostrato che le proteine coinvolte nel ciclo degli esteri del colesterolo potrebbero rappresentare degli elementi importanti nella proliferazione cellulare e nella progressione dello pterigio.

Inoltre, questi risultati supportano il ruolo potenziale come medicazioni a livello topico dei farmaci antiproliferativi EVE e PIO, allo scopo di prevenire ed inibire la crescita dello pterigio agli stadi iniziali della patologia, probabilmente attraverso la modulazione del metabolismo degli esteri.

## *La Leucemia*

Leucemia, termine di origine greca, significa letteralmente "sangue bianco". Il nome si spiega col fatto che in questo genere di malattie il numero dei globuli bianchi (leucociti) può essere elevato. Data la loro origine questi tumori non sono solidi, in altre parole non sono connotati dalla presenza di una massa tumorale, ma dalla proliferazione incontrollata di queste cellule che invadono tessuti e organi. I globuli bianchi si formano nel midollo osseo come i globuli rossi (eritrociti).

I leucociti hanno un'importante funzione nel sistema immunitario dell'organismo. Essi sono costituiti da molte sottofamiglie: i linfociti T e i linfociti B; i leucociti neutrofili, eosinofili e basofili, detti anche granulociti; i monociti che, al bisogno, si trasformano in macrofagi (spazzini). I linfociti derivano da un progenitore comune linfoide, granulociti e monociti condividono, invece, un precursore mieloide, per cui le leucemie si suddividono ulteriormente in linfocitiche e mieloidi, in base al sottotipo di popolazione che ha subito la degenerazione maligna. Dal punto di vista clinico, poi, le leucemie possono essere acute o croniche: le prime hanno prognosi più severa e decorso molto rapido, le seconde decorrono più lentamente e sono meglio controllabili con i farmaci, tanto da poter divenire appunto croniche.

Nelle cellule leucemiche generalmente si osservano alterazioni dell'omeostasi del colesterolo (Chen, Kandutsch 1978; Parsons, Skapek 1997). Studi recenti da noi condotti hanno evidenziato una possibile correlazione tra l'espressione



dell'MDR (multidrug resistance), l'esterificazione del colesterolo e la crescita di cellule leucemiche.

A tal proposito le cellule leucemiche isolate da pazienti con leucemia linfocitica acuta o cronica (ALL e CLL), sono state usate per studiare gli effetti, degli inibitori dell'esterificazione del colesterolo, sulla proliferazione cellulare e sull'espressione genica dell'MDR1. Comparate ai linfociti normali le cellule leucemiche presentano un maggior accumulo degli esteri del colesterolo e un aumento dell'espressione genica dell'MDR1 e rispondono agli stimoli mitogeni aumentando questi livelli. Contrariamente nel siero di tutti i pazienti ALL e CLL sono stati trovati bassi livelli di HDL-C (Dessi, Batetta 1991;1995;1992; Batetta ,Mulas 2003; Batetta, Pani 1999; Rao, Kottapally 1986.). In seguito ai trattamenti delle cellule leucemiche con gli inibitori dell'esterificazione del colesterolo (Pg e Sah) si ha una riduzione della proliferazione cellulare del 60% e questa è associata anche a una riduzione dell'espressione genica dell'MDR1. I nostri risultati suggeriscono che l'esterificazione del colesterolo e l'MDR1 possono essere coinvolti nella regolazione della crescita delle cellule leucemiche modulando il traffico intracellulare del colesterolo e il suo contenuto nelle rafts. Inoltre i farmaci che inibiscono sia l'esterificazione del colesterolo sia l'espressione dell'MDR1 potrebbero considerarsi agenti antitumorali.

## ***Generalità sullo pterigio***

Lo pterigio nella, definizione tradizionale, è una piccola formazione fibrovascolare a forma di triangolo che parte dalla congiuntiva interpalpebrale nasale e va verso la cornea sino a ricoprirla; viene inserito tra le patologie degenerative e iperplastiche primitive della congiuntiva e differenziato da forme cliniche di aspetto simile ma con diversa eziologia, dette pseudopterigi o meglio pterigoidi (Dushku et al 2001).

Dal limbus dove sembra originare si evolve con molta lentezza nel corso degli anni e la sua evoluzione non è costante ma presenta periodi di quiescenza clinica ed episodi cosiddetti infiammatori, durante i quali la crescita è più rapida. In genere però l'evoluzione è molto lenta.

Nelle forme aggressive cresce e si dirige verso il centro della cornea, presentando un comportamento clinico simile alle neoformazioni della superficie oculare quali infiltrazione della cornea e tendenza alle recidive dopo la rimozione.

Nelle forme iniziali e stazionarie il medico oculista limita il suo intervento ad una valutazione del quadro clinico ed al controllo della sua evoluzione. Il trattamento in questi casi non è indicato, ma a volte è lo stesso paziente che richiede la sua rimozione per motivi estetici o perché riduce la tolleranza alle lenti a contatto.

Nelle forme più avanzate, quando lo pterigio ha ormai invaso la cornea, l'evoluzione crea una certa preoccupazione nel paziente per l'insorgenza di fastidiosi sintomi irritativi o per una riduzione del visus. In questi casi, l'oculista, dopo aver

accertato la presenza o meno di caratteri clinici di evoluzione, indica il trattamento chirurgico più idoneo.

Nei casi di pterigi particolarmente evoluti, la crescita sulla cornea e l'invasione del campo pupillare rendono necessario l'intervento e il trattamento richiede una certa esperienza.

In queste circostanze la situazione clinica pone alcune delicate problematiche quali il trattamento della zona ottica, le recidive e la riparazione della congiuntiva.

### *Epidemiologia*

Lo pterigio predilige le aree geografiche calde e soleggiate, altrove l'incidenza è bassa o trascurabile. Nelle regioni temperate la frequenza nella popolazione si aggira intorno al 2%, mentre nelle regioni tropicali raggiunge una prevalenza da un minimo del 6% sino ad oltre il 20%.

La prevalenza dello pterigio si ha nella fascia tropicale entro le latitudini 30°-Nord e 30°-Sud dell'equatore mentre, allontanandosi da queste fasce, l'incidenza nella popolazione si riduce progressivamente (Detels, Dhir 1999).

Studi epidemiologici su popolazioni di vaste aree geografiche hanno evidenziato il ruolo svolto dai fattori ambientali nella patogenesi dello pterigio, e riconosciuto i fattori di rischio principali e quelli di minore importanza. (Saw, Tan 1999; Lancet 1, 1984)

La correlazione con l'esposizione ai raggi ultravioletti (UV) è evidente ed unanimemente accettata (Moran, Hollows 1984). Lo pterigio può manifestarsi quando l'esposizione è quotidiana e prolungata per anni: l'età maggiormente

suscettibile per l'effetto degli UV è risultata essere la terza decade di vita.

I raggi ultravioletti, sono correlati con altre patologie iperplastico/degenerative e tumorali delle superbie oculari e della cute. Le categorie di persone che, per ovvi motivi, sono maggiormente esposte ai fattori di rischio sono gli agricoltori, i marittimi e i pescatori, gli edili, i saldatori, o comunque tutti quei soggetti che, trascorrendo molte ore del giorno all'aria aperta, sono particolarmente esposti all'azione dei raggi solari.

Taylor riporta che i fattori ambientali e climatici hanno maggiore influenza nelle aree geografiche dove l'umidità relativa media annuale è compresa tra il 40% - 59%, piuttosto che nelle zone sabbiose dove prevale un clima secco e ventilato (Taylor,H.R. 1989; Taylor,H.R.1982).

Lo pterigio prevale, anche se di poco, nel sesso maschile e l'età media di insorgenza è stata calcolata in 44 anni e con la sesta decade di vita è la più interessata. Alcune razze umane sono più predisposte, ad esempio la razza indiana è più colpita di quella bianca, la razza thailandese più di quella cinese, quella africana di pelle scura più degli arabi di pelle chiara (Saw, et al 199)

### *Fattori di rischio*

I fattori di rischio principali o primari per l'insorgenza dello pterigio vanno ricercati nell'ambiente di vita e di lavoro della persona ed è compito dello specialista informare il paziente sul ruolo che questi hanno nell'evoluzione clinica della lesione. Il paziente più a rischio è il giovane adulto che per motivi professionali od ambientali è esposto ad una dose

quotidiana di UV e non utilizza occhiali da sole o schermi protettivi. Secondo alcuni autori, lo pterigio si trasmette con ereditarietà multifattoriale a penetranza incompleta ed espressività variabile.

Altri autori segnalano un' ereditarietà di tipo dominante a bassa penetranza, e l' ereditarietà non riguarderebbe la lesione ma una predisposizione della congiuntiva a reagire in maniera anormale agli stimoli atmosferici- ambientali (Hecht, Shoptaugh 1990).

E' noto che in alcune famiglie l'incidenza dello pterigio è molto più elevata della media geografica ed il fattore ereditario risulta dimostrato (Ghassibe et al, 2004), ma resta il dubbio che siano invece dei fattori di rischio ad agire nello stesso ambiente familiare e nei suoi componenti per varie generazioni (ad esempio famiglie di pescatori o muratori) piuttosto che il fattore genetico. L' ereditarietà rimane quindi un fattore da chiarire e saranno necessari ulteriori studi epidemiologici.

Esistono infine altri fattori di rischio ambientali e individuali che agiscono da concause e con sinergia con i fattori primari e rivestono anch'essi una certa importanza nella prevenzione.

I fattori di rischio si possono suddividere in due gruppi :

*1. Fattori Intrinseci*

*2. Fattori Estrinseci*

Tra i fattori intrinseci si considera l' ereditarietà, le alterazioni quantitative e qualitative del film lacrimale, le congiuntiviti croniche irritative. Alcuni stati carenziali, come

l'ipovitaminosi A, sarebbero responsabili di alterazioni dello strato mucoso lacrimale e del turnover dell'epitelio corneo-congiuntivale e viene considerata un fattore di rischio intrinseco di rischio. La razza è un fattore intrinseco, mentre l'area geografica è un fattore estrinseco.

I fattori intrinseci sono rappresentati principalmente dall'esposizione agli UV e dai microtraumi della superficie oculare per motivi professionali. L'importanza dell'esposizione ai microtraumi nel lavoro è indiscutibile (allergeni, vento, polvere, fumo o altri stimoli nocivi).E gli agricoltori, marinai, falegnami, saldatori, muratori rappresentano delle categorie di lavoratori esposti ad un notevole rischio.

Le infezioni microbiche e virali sarebbero di secondaria importanza ma in certe popolazioni, ad esempio, il tracoma concorre a determinare un'alterazione secondaria del film lacrimale e predispone la congiuntiva all'azione lesiva dei fattori ambientali (Vedi Tabella).

Tab. 1: Fattori di rischio principali o primari per l'insorgenza dello pterigio

<b><i>FATTORI INTRINSECI</i></b>	<b><i>FATTORI ESTRINSECI</i></b>
<i>Ereditarietà</i>	Esposizione cronica agli UV
<i>Alterazioni Lacrimali</i>	Microtraumatismi oculari
<i>Ipovitaminosi A</i>	Infezioni microbiche
<i>Razza</i>	
<i>Cheratosi solare</i>	

### *Quadri clinici e classificazione*

Le caratteristiche morfologiche e la compromissione della cornea consentono di classificare alcune forme cliniche e suddividerle in tre tipi principali. I gruppi di classificazione si differenziano a seconda dell'evoluzione e della gravità del quadro clinico dalle forme iniziali sino alle forme più evolute.

Le caratteristiche cliniche che vengono considerate per questa classificazione sono: le dimensioni, la vascolarizzazione, l'estensione sotto la superficie corneale, l'interessamento della zona ottica, la presenza di complicanze (Tan, Chee, 1997).

#### ***Pterigio primario di piccole dimensioni*** (Tipo 1)

In questa categoria sono comprese forme iniziali di pterigio primario, poco evolute. Si tratta di lesioni primarie al limbus o interessano, marginalmente la cornea. In queste forme la sintomatologia e le complicanze sono pressoché assenti trattandosi di forme stazionarie con evoluzione clinica lentissima. La morfologia della lampada a fessura consente di apprezzare tre aspetti differenti dello pterigio:

*Aspetto fibroso*: lo pterigio si presenta come un piccolo cerchio biancastro o giallastro parallelo al limbus con vasi congiuntivali che convergono verso di esso. Non si apprezza chiaramente il corpo che si perde nella congiuntiva sana circostante (tabella 2, pag. 16).

*Aspetto pinguecolare* : lo pterigio ha un aspetto simile a una pinguecola, è rilevato rispetto al limbus e l'apice non invade la cornea che appare stressata da una piccola area di 2-3mm, di infiltrazione dello stroma.



Il corpo è costituito da una leggera vascolarizzazione orizzontale al canto interno spesso difficile da delimitare dalla congiuntiva sana circostante (tabella 2, pag.16).

*Aspetto classico:* E' il classico pterigio in cui vengono chiaramente definite le varie porzioni; testa o apice, collaretto e margini, corpo.

L'apice interessa per 1 o 2 mm la cornea. Questo terzo aspetto si riscontra in poco più di un terzo dei casi di pterigio di tipo 1.

***Pterigio primario o recidivo evoluto con zona ottica risparmiata (Tipo 2)***

Rappresenta il gruppo più numeroso e comprende sia forme primarie che recidive. L'aspetto è quello di uno pterigio nel quale è possibile distinguere chiaramente tutte le varie parti anatomiche. La testa è rilevata ed invade la cornea sino a lambire la zona ottica, l'area di infiltrazione circostante è visibile anche ad occhio nudo. Il corpo è solcato da capillari dilatati che formano una fascia neovascolarizzata che si apre a ventaglio al canto interno. La sintomatologia irritativa in questi pazienti è costante e la riduzione del visus, quando presente, è causata da un astigmatismo indotto o da fenomeno di diffrazione della luce (tabella 2, pag.16).

***Pterigio primario o recidivo evoluto con zona ottica***

***interessata (tipo 3)*** Rappresenta la forma più evoluta di pterigio. L'invasione della zona ottica costituisce la caratteristica distintiva di questo gruppo di pterigi.

La crescita dello pterigio è tale che l'apice invade il campo pupillare e l'infiltrazione dello stroma raggiunge almeno

il 30% dello spessore corneale. La riduzione del visus è sempre marcata e causata dall'astigmatismo e compromissione della zona ottica.

Le caratteristiche dello pterigio di Tipo 3 rappresentate da un collaretto molto evidente che può estendersi per 8-10mm nel limbus, da un corpo particolarmente sviluppato in cui prevale la componente fibrosa sottocongiuntivale molto tenace, che in certi casi può contrarre aderenze con la capsula che avvolge il tendine del muscolo retto mediale e limitare l'abduzione del bulbo, oppure causare nei fornici congiuntivali quadri di bulbo, oppure causare nei fornici congiuntivali quadri symblefaron cicatriziale o ectropion del puntino lacrimale inferiore. Lo pterigio di Tipo 3 comprende anche quelle forme di pterigio che presentano una rapida evoluzione e violente recidive post-operatorie che vengono etichettate con il termine di "pterigio maligno"(Tabella 2, pag.16).

### ***Pterigio di tipo 1***



**Aspetto Fibroso:** piccolo cercine biancastro giallastro parallelo al limbus. Vasi congiuntivali convergenti verso il cercine. Non si apprezza distintamente un corpo.

**Aspetto Pinguecolare:** aspetto simile ad una pinguecola, sporgente. La testa è appena apprezzabile e non invade la cornea: è però presente un'infiltrazione stremale di 2-3mm.

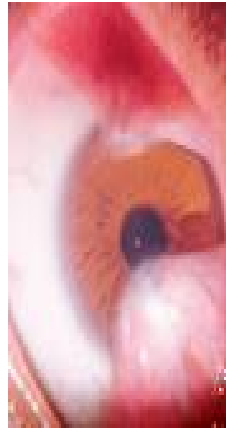
**Aspetto classico:** vengono chiaramente definite tutte le porzioni. l'apice interessa per 1-2 mm la cornea

### ***Pterigio di tipo 2 “PRIMARIO O RECIDIVO”***



**Tipo 2:** Pterigio primario o recidivo. Presenta sintomatologia irritativa ed iniziale riduzione del visus per astigmatismo irregolare. La cornea è invasa per 2-4mm e lambisce la zona ottica. Il corpo è ispessito con vasi capillari dilatati e congesti. L'area di infiltrazione corneale è visibile anche ad occhio nudo.

### ***Pterigio di tipo 3***



**TIPO 3:** Pterigio recidivo molto evoluto o maligno. Sintomatologia marcata con grande riduzione del visus. Possono essere presenti disturbi oculomotori ed epifora. L'apice invade la cornea per oltre 4mm e raggiunge la zona ottica. E' da sempre presente una riduzione del visus. Il collo è esteso (sino a 8-10 mm). E il corpo si estende a tutto il canto interno.

***Tab.2 : Classificazione dello pterigio in base alle sue caratteristiche morfologiche***

## *Anatomia Clinica*

La congiuntiva bulbare del canto interno è la sede prediletta dello pterigio (91%). La bilateralità della lesione si ha nel 25% circa dei pazienti e la duplicazione nello stesso occhio è molto rara, la localizzazione temporale è possibile.

All'esame con la lampada a fessura è possibile distinguere nello pterigio alcune caratteristiche morfologiche ed anatomiche che permettono di differenziarlo e classificarlo nelle varie forme cliniche.

Lo pterigio subisce negli anni e nel corso della sua progressione dei cambiamenti morfologici che permettono di distinguere se lo pterigio è in una condizione di stazionarietà o di ulteriore crescita.

La conoscenza di questi aspetti clinici è molto importante nella gestione di uno pterigio perché consente di classificarne le forme cliniche e di esprimere, entro certi limiti, una prognosi sulla evoluzione e decidere il trattamento che offre le migliori possibilità terapeutiche. Nello pterigio, partendo dalla cornea verso la congiuntiva, possiamo distinguere (Tabella 3, pag 58).

**Il cappuccio:** precede sulla cornea l'apice dello pterigio. E' visibile come un intorbidamento grigiastro semilunare avascolare dell'epitelio corneale circostante l'apice.

Nello pterigio in fase di crescita, a livello del cappuccio, sono presenti micro-ulcerazioni epiteliali colorabili con la fluorescina e lo stroma sottostante presenta un certo grado di intorbidamento. Nelle forme stazionarie non si colora e lo stroma rimane trasparente.

Le **chiazze di Fuchs:** sono visibili come piccole opacità grigiastre davanti al cappuccio e sotto l'epitelio corneale. Nelle fasi di attivazione, a causa delle micro-ulcerazioni epiteliali del cappuccio e per l'infiltrazione stromale sottostante, le chiazze di Fuchs sono poco evidenti. Nelle forme stazionarie invece questi isolotti di opacizzazione sono chiaramente definiti e ricoperti da un epitelio integro.

La **linea di Stoker:** E' visibile come una sottile linea semilunare di colore giallo-verde davanti all'apice. Si forma per accumulo di emosiderina a livello della membrana di Bowman. La linea di Stoker rappresenta un marker morfologico di cronicità della lesione e indica che lo pterigio negli ultimi anni non è progredito. Essa infatti è apprezzabile in molti pterigi stazionari, mentre non ha il tempo di formarsi nelle lesioni a crescita più rapida.

L'**apice o testa** : rappresenta la porzione dello pterigio che invade la cornea. In genere si presenta biancastro, rilevato e fortemente aderente alla cornea sottostante. Nelle forme stazionarie appare di colorito biancastro e poco rilevato con una vascolarizzazione poco apprezzabile. Nello pterigio "evolutivo"

l'apice è sporgente sulla superficie oculare e vascolarizzato con margini frastagliati e con piccoli capillari anastomizzati con il plesso limbare.

Il **collareto o collo**: è apprezzabile in tutti gli pterigi e rappresenta la porzione limbare della lesione. Può essere meno esteso e si continua con il corpo.

Il **corpo**: è una plica o banda di tessuto molto vascolarizzato, in genere di forma trapezoidale che si estende medialmente sino alla plica semilunare. I vasi del corpo assumono un decorso rettilineo come se fossero stirati. Esiste un piano naturale di clivaggio con il tessuto episclerale sottostante.

Il colore e l'aspetto del corpo dello pterigio cambiano nelle differenti fasi cliniche; nelle forme stazionarie è poco rilevato e si presenta come una banda rosa di capillari sottili e rettilinei mentre nelle fasi di attivazione è di colore rosso vivo o livido a causa della vascolarizzazione congiuntivale e del tessuto fibrovascolare sottostante; i capillari sono numerosi, dilatati e anastomizzati tra loro.

I **margini**: sono rappresentati dalle pliche o pieghe congiuntivali che delimitano i confini tra il corpo dello pterigio e la congiuntiva bulbare circostante, essi possono essere leggermente sollevati nello pterigio evoluto e sottili nelle forme poco evolute e stazionarie.

<i>Pterigio stazionario</i>	<b>Cappuccio</b>	<i>Intorbidamento grigiastro semilunare avascolare dell'epitelio corneale non colorabile con fluorescina</i>
	<b>Chiazze di Fuchs</b>	Visibili distintamente come piccole zone grigiastre irregolari davanti al cappuccio in sede sottoepiteliale, nello stroma superficiale.
	<b>Linea di Stoker</b>	Visibile come linea giallo-brunastra semilunare davanti alla testa. E' indice di cronicità.
	<b>Apice o testa</b>	Biancastro, poco rilevato e poco vascolarizzato
	<b>Corpo</b>	Poco rilevato di colore perlaceo o rosa. La vascolarizzazione è scarsa e sono visibili i vasi episclerali.
<i>Pterigio attivo - evolutivo</i>	<b>Cappuccio</b>	<i>Sono presenti delle microulcerazioni epiteliali colorabili con la fluorescina. Lo stroma sottostante presenta un certo intorbidamento.</i>
	<b>Chiazze di Fuchs</b>	Poco visibili a causa delle microulcerazioni epiteliali e per l'intorbidamento del cappuccio.
	<b>Linea di Stoker</b>	Uno pterigio in rapida crescita non permette la formazione della linea di Stocker.
	<b>Apice o testa</b>	Molto vascolarizzato e rilevato; si possono apprezzare piccoli capillari anastomizzati con il plesso limbare.
	<b>Corpo</b>	Il corpo è rosso vivo o livido, è ispessito e rilevato e di aspetto carnoso per i numerosi capillari dilatati e congesti.

Tabella 3: Anatomia clinica dello pterigio

## *Sintomatologia*

La sintomatologia dello pterigio è proporzionata al suo quadro clinico. Nelle forme di pterigio di Tipo 1 la sintomatologia è pressoché assente o modesta, mentre nelle forme più evolute è sempre presente una sintomatologia irritativa e una compromissione del visus.

I disturbi irritativi, sebbene in varia misura, sono disturbi dello pterigio di Tipo2 e di Tipo3, nei quali la testa causa un astigmatismo irregolare o invade la zona ottica.

Questi disturbi sono aspecifici: fotofobia, bruciore all'esposizione al caldo o al freddo, sensazione di corpo estraneo con lacrimazione occasionale oppure continua e fastidiosa. I sintomi si accentuano nelle fasi di "infiammazione" dello pterigio in quanto, a causa delle micro-ulcerazioni corneali intorno alla testa di esso, si associa una sintomatologia dolorosa. La riduzione del visus si manifesta quando la crescita dello pterigio sulla cornea raggiunge i 3-4mm, ma sono stati osservati disturbi del visus anche in pazienti con quadri meno evoluti. Prima della riduzione del visus, il paziente lamenta disturbi di abbagliamento riferiti come difficoltà alla guida di notte o come visione "raggiata" delle luci. Questo disturbo è frequente, anche in pterigi di piccole dimensioni, ed è causato da una riduzione della sensibilità al contrasto. Inoltre, non esiste una correlazione lineare tra l'entità dell'abbagliamento e l'estensione corneale dello pterigio ed i test per misurare la soglia di contrasto sotto "stress" luminoso sono risultati positivi in tutti i pazienti con pterigio sebbene con differente entità; la riduzione riguarda principalmente le frequenze spaziali



medio/basse. Per quanto riguarda la cornea normale, il film lacrimale è uniforme e lo stroma presenta una regolarità spaziale delle lamelle e delle singole fibre, questa situazione fornisce una condizione fisica ottimale per la formazione di un'immagine nitida e la simultanea presenza di questi fattori impedisce la diffrazione della luce incidente sulla cornea.

Nello pterigio, per la presenza di opacità corneali periferiche e per alterazioni del film lacrimale i fenomeni di diffrazione della luce incidente sono maggiori e la capacità di discernere il contrasto è ridotta. I fenomeni di diffrazione e le alterazioni del visus compaiono e si evidenziano quando il diametro pupillare raggiunge e supera i 6 mm, mentre sono irrilevanti con diametri tra i 2-4 mm.

La riduzione del visus nello pterigio è provocata essenzialmente da due fattori: l'astigmatismo indotto e l'invasione della zona ottica. L'astigmatismo nello pterigio è determinato da più fattori, che possono agire singolarmente o in associazione. La crescita della testa dello pterigio sulla cornea produce sempre una deformazione della curvatura corneale.

Nei casi di pterigio, dove il tessuto fibroso crea tenaci aderenze con le strutture del canto interno, oltre alla deformazione statica si somma l'effetto attrattivo nelle posizioni estreme di sguardo ed in questi casi lo pterigio produce una forza che varia di intensità al variare del movimento del bulbo.

La deformazione statica agisce in un'unica direzione e le variazioni di curvatura della cornea non avvengono su un intero meridiano ma su un semi-meridiano producendo un astigmatismo irregolare e asimmetrico. La deformazione

dinamica è causata dai movimenti del bulbo oculare, soprattutto dell'abduzione. Essa può essere visualizzata, in pterigi molto evoluti, mediante la lampada a fessura come comparsa di sottili strie della membrana di Descemet quando il paziente è invitato a guardare nella direzione opposta alla sede dello pterigio, oppure mediante mappe comparative con la topografia corneale eseguendo l'esame in posizione primaria ed in posizione eccentrica.

La topografia corneale computerizzata si sta dimostrando un esame molto utile nella semiologia dello pterigio perché consente di valutare i cambiamenti della curvatura della cornea indotti dallo pterigio, ed offrendo utili informazioni sulla tipologia dell'astigmatismo, sull'estensione della deformazione, e mediante mappe differenziali, sui cambiamenti indotti dalla chirurgia. La causa di queste complicanze è la proliferazione di tessuto fibrovascolare sottocongiuntivale che contrae tenaci aderenze con il tessuto connettivale dei fornici e con le espansioni capsulari tendinee del muscolo retto mediale. Nei casi più gravi, può coesistere un modesto enoftalmo nelle posizioni estreme di sguardo. E' da ricordare che, con il medesimo meccanismo, in alcune gravi forme di pterigio, è presente un ectropion dei puntini lacrimali con epifora persistente.

### *Eziologia*

I meccanismi biologici e patogenetici che causano lo pterigio non sono perfettamente conosciuti e le teorie eziologiche proposte non chiariscono completamente la natura e l'origine di questa lesione.

Ricordiamo le principali teorie eziologiche e patogenetiche

***Ereditarietà***: Lo pterigio, Sedan e Enroth, è ereditario e si trasmette con ereditarietà dominante e penetranza incompleta (Sedan, J 1965; Enroth, C 1951).

L'ereditarietà viene sospettata per un'incidenza molto alta in certe famiglie e per varie generazioni. Secondo altri autori, l'ereditarietà riguarderebbe una maggiore predisposizione della congiuntiva a reagire in maniera anomala a stimoli atmosferico-ambientali.

***Pinguecolare***: Teoria proposta da Fuchs e poi ripresa da Guillermo Pico e da altri. Questi autori individuano nella pinguecola la lesione primaria da cui prende origine lo pterigio; microlesioni del limbus, causate da fattori ambientali o lacrimali, provocherebbero una reazione del ricoprimento congiuntivale. La lesione, quando interessa la cornea, produrrebbe un edema circoscritto in grado di favorire la migrazione di cheratoblasti lombari, il cosiddetto "fronte di avanzamento" della lesione o "area progressiva di Fuchs, visibili nello stroma superficiale della cornea come isolotti cellulari. Questa teoria prende spunto dalla somiglianza istologica dello pterigio e della pinguecola. Pico, a riprova della sua teoria, segnala come le pinguecole si riscontrano frequentemente nell'occhio controlaterale allo pterigio. Contro questa teoria però bisogna considerare che la pinguecola, pur causata dagli ultravioletti solari, è comune in regioni dove lo pterigio è raro, come in Giappone.

***Infiammatoria:*** E' una teoria che ha avuto in passato molti illustri sostenitori; erosioni e microulcerazioni del limbus provocate da stimolazioni ambientali o professionali avrebbero stimoli infiammatori sufficienti ad "attivare", con una infiammazione subclinica, la congiuntiva bulbare allo scopo di riparare la lesione. In questa teoria, come in quella pinguecolare di Fuchs e Pico, il primum movens è lo stesso.

***Anomalia del film lacrimale:*** Una discontinuità del film lacrimale con formazioni di piccole microulcerazioni epiteliali sarebbe lo stimolo iniziale alla proliferazione del tessuto fibrovascolare sottocongiuntivale. Jose Barraquer enfatizza il ruolo della secchezza della cornea davanti alla testa dello pterigio come stimolo alla sua progressione. Comunque, un'alterazione quantitativa e qualitativa del film lacrimale è presente in tutti gli pterigi.

***Immunitaria:*** L'autore ipotizza uno squilibrio dell'immunità cellulo-mediata a livello della congiuntiva. Tecniche di immunoistochimica hanno evidenziato che, nel tessuto escisso da pterigi, una popolazione di cellule immunocompetenti con prevalenza di linfociti T CD3 con attività soppressoria. Nella congiuntiva normale i linfociti sono normalmente in un rapporto helper/suppressor di 1:1,5 mentre nello pterigio il rapporto medio è 1:2,7. Oltre ai linfociti T sono stati ritrovati mastociti, plasmacellule e depositi di immunoglobuline che presentano un caratteristico pattern granulare. La presenza di immunoglobuline IgE, IgG e cellule immunocompetenti sembrerebbe indicare che nello pterigio avvengano delle reazioni immunitarie di ipersensibilità di tipo

1,3,4. Non è stato però chiarito se le reazioni immunitarie intervengono nella fase di sviluppo o crescita della lesione o se rappresentano reazioni di risposta a un tessuto danneggiato.

***Teoria dei raggi ultravioletti ambientali:*** Questa teoria ipotizza l'insorgenza dello pterigio per un perfetto cumulativo degli UV assorbite dalla superficie oculare. Gli UV causano alterazioni istologiche nelle cellule epiteliali e nel tessuto sottomucoso congiuntivale e sarebbero i responsabili anche di patologie croniche della congiuntiva e della cornea.

Le radiazioni ultraviolette comprese tra i 290 e i 320 nm sono assorbite selettivamente allo strato epiteliale e sottoepiteliale della superficie oculare. L'effetto fototossico degli UV è maggiore per gli UV-A ed il danno di questi raggi può essere incrementato dalla presenza di sostanze endogene che, possedendo attività fotosensibilizzanti, accentuano il danno da ultravioletti. Le singole dosi elevate di UV sono in grado di causare delle cherato-congiuntiviti attiniche, con il ben noto quadro clinico di sofferenza dell'epitelio corneale e congiuntivale accompagnato da una forte sintomatologia dolorosa. Le dosi croniche quotidiane, invece, sono capaci di danneggiare permanentemente la superficie oculare producendo degenerazione della membrana di Bowman e delle lamelle stremali superficiali, fino a provocare la neovascolarizzazione periferica dello stroma. La cornea, per la sua particolare forma di calota sferica e per il suo raggio di curvatura, si comporta in maniera del tutto particolare nei confronti della luce incidente sulla sua superficie; una parte della luce incidente viene

focalizzata dai mezzi diottrici sulla retina, un'altra parte diffonde all'interno dello stroma (scattering).

E' stato dimostrato che la luce proveniente dalla superficie corneale e dallo stroma si concentra soprattutto nel limbus, fino a 20 volte rispetto alla parte rimanente di cornea. La luce che incide sulla cornea dal lato temporale si concentra nel limbus nasale, mentre la luce che proviene dal settore nasale si concentra in misura minore al limbus temporale per la presenza del naso. Il suddetto fenomeno, dimostrato con un modello matematico, è più marcato nelle cornee con più curve dove la concentrazione al limbus è maggiore rispetto a quelle più piatte. Questo fenomeno è spiegabile con la maggiore frequenza dello pterigio per il limbus nasale.

**Teoria limbare:** fino a qualche anno fa, il limbus era considerato come una zona di passaggio tra la cornea, sclera e congiuntiva, cioè una regione anatomica priva di una propria individualità funzionale. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno definitivamente dimostrato che il limbus invece possiede importanti funzioni di regolazione e proliferazione dell'epitelio corneale ed è in grado di funzionare da barriera contro stimoli e patologie provenienti dalla congiuntiva. Non esistono tuttavia degli elementi sicuri per sostenere che il limbus sia la sede di partenza di stimoli metabolici in grado di innescare un meccanismo proliferativo come lo pterigio, ma esistono prove indirette che indicano come il danno al limbus rappresenti il primum movens dello pterigio.

Una prova indiretta è la constatazione clinica che, nella chirurgia dello pterigio, il trattamento circoscritto alla

componente congiuntivale causa frequenti recidive, mentre un trattamento limare, che ripristina una certa funzione di barriera, offre risultati terapeutici superiori. L'immunoistochimica utilizzando anticorpi monoclonali specifici per le citocheratine delle cellule epiteliali della congiuntiva e della cornea, sembra evidenziare che le cellule da cui si origina lo pterigio siano cellule staminali del limbus; queste cellule normalmente fisse, forse sotto l'effetto di fattori eziologici ambientali (UV) o di altri fattori locali, e tramite l'effetto di mediatori tessutali darebbero origine a cellule figlie in grado di migrare al di sotto della membrana basale dell'epitelio congiuntivale e corneale (cheratoblasti migranti).

Le cellule durante la loro avanzata verso la cornea sarebbero in grado di danneggiare e distruggere la lamina di Bowman e di infiltrare le lamelle stromali superficiali. I cheratoblasti durante la loro migrazione non possederebbero un'attività fibroblastica che acquisirebbero al termine della migrazione.

**Tumorale:** lo pterigio mostra caratteristiche che possono suggerire una crescita eccessiva o disordinata, infatti vengono descritte caratteristiche istologiche tumorali, classificate da moderata displasia a carcinoma in situ o locale. Negli ultimi anni diversi studi sono stati concentrati sulle mutazioni genetiche e sui cambiamenti epigenetici che avvengono nello pterigio. Queste alterazioni sono simili a quelle osservate in diversi tipi di neoplasie in cui c'è un danno nella regolazione e nel controllo del ciclo cellulare. A questo riguardo, sono stati accumulati dati controversi sul ruolo della

proteina p53: autori come Dushku e Reid, Tan e Weinstein riportano alti livelli di espressione della p53 nell'epitelio sovrapposto allo pterigio e ipotizzano l'esistenza di una mutazione del gene della p53; altri studi, invece, hanno fallito nell'individuare un incremento del livello di questa proteina e di eventuali sue varianti mutate espresse a livello dello pterigio.

Nel 16.3% dei casi di pterigio è stata riscontrata l'inattivazione, da ipermetilazione, del promoter del gene oncosoppressore P16 e una riduzione della sua espressione proteica che determina una regolazione anormale del ciclo cellulare (Chen, Cheng 2006). L'anormale metilazione del promoter del gene p16 e la sua conseguente inattivazione giocano un ruolo importante nella patogenesi di molti tipi di neoplasie umane (Fearon et al 1998). I papillomavirus umani (HPVs), in particolare i tipi 16 e 18, sono stati trovati nello pterigio (Dushku et al 1999) a livello del limbus (specialmente in aree geografiche come la Sardegna); tuttavia, sembrerebbe che il virus non rappresenti un cofattore per l'eziologia del tumore, ma piuttosto lo sia l'iperespressione della proteina p53 mutata, correlata all'irradiazione con gli UV (Dushku et al 1999).

Inoltre i raggi ultravioletti, a lungo associati agli agenti eziologici che scatenano i tumori della pelle come il melanoma, favoriscono mutazioni a livello delle cellule basali e delle cellule squamose del carcinoma. Recentemente, il fattore di crescita epidermico che si lega all'eparina (HB-EGF), un potente mitogeno, è stato localizzato nel tessuto dello pterigio ed è stato dimostrato che la sua espressione può essere indotta in modo significativo dall'azione degli UV-B in cellule



epiteliali derivate dallo pterigio (Nolan et al 2003; Nolan Di Girolamo 2004). Attraverso saggi di immunoistochimica sono stati trovati nei tessuti di pterigio diversi fattori di crescita angiogenici e fibrogenici come il fattore basico di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)-BB, e il fattore di crescita tumorale (TGF)- $\beta$ 1(Kria, Ohira 1996) Infatti i fibroblasti di pterigio determinano, in coltura, una overespressione delle metalloproteinasi di matrice(MMP)-1 e (MMP)-3 e degli inibitori tissutali delle metallo proteinasi (TIMP)-1 e (TIMP)-2 attraverso l'attivazione dell' ERK1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent pathway coinvolta nella proliferazione cellulare dei melanomi (Vincenti,White 1996; Huntington,Shields 2004)

Studi su analisi di microarray dei livelli di mRNA dei geni legati alla crescita cellulare, e alla cancerogenesi sono modificati nello pterigio; in particolare, aumenta l'espressione genica dell'IGFBP-2 e diminuisce l'espressione IGFBP-3 Entrambi questi geni sono stati associati alla presenza di tumore (Solomon, Grueterich 2003; Wong, Chew 2006).

I fibroblasti dello pterigio, inoltre, presentano caratteristiche fenotipiche anomale (Chen,Tsai 1994), come instabilità dei micro satelliti (Spandidos,Sourvinos 1997), perdita di eterozigoti ed alto livello di attività mitotica (Tan, Liu 2000). Queste proprietà sono state riscontrate anche in tessuti neoplastici e suggeriscono che lo pterigio possa rappresentare una forma di lesione neoplastica benigna.

## ***Materiali e Metodi***

*Selezione dei pazienti:* Per la sperimentazione sono state valutate 2 classi di pazienti. Per lo studio dei fibroblasti sono stati utilizzati 12 campioni totali: sei provenivano da pazienti con pterigio primario (di età compresa tra i 45-65 anni, con un'età media di 55 anni); gli altri sei campioni, prelevati da individui non affetti, sono stati utilizzati come controlli.

I sei pazienti (tre uomini e tre donne) presentavano livelli di colesterolo plasmatico entro i limiti normali e la diagnosi di pterigio, come precedentemente indicato, era stata posta basandosi sulla storia clinica e sulla valutazione dei sintomi. Tutti i soggetti affetti presentavano da più di tre anni una lesione a evoluzione lenta, con un'estensione corneale di almeno 4 mm misurata con un "caliper" dal limbus al vertice della cornea.

La morfologia dello pterigio è stata clinicamente classificata con l'uso del sistema di Tan, basato sulla valutazione della traslucenza dello pterigio: atrofico (T1), intermedio (T2), maligno (T3). Tutti i campioni di pterigio utilizzati in questo studio appartenevano allo stadio T3.

Il gruppo di controllo (i restanti 6 pazienti) aveva un'età media di 63 anni ed era formato da 3 uomini e 3 donne sottoposti a rimozione della cataratta presso la Clinica Oculistica di Cagliari. Al momento del prelievo nessuno dei soggetti del gruppo di controllo manifestava alcun segno o sintomo di tipo infiammatorio.

Il secondo gruppo, invece, è costituito da 5 pazienti, di cui 3 con pterigio e 2 sani. I tessuti di questi pazienti prelevati

(con le stesse modalità già descritte per i fibroblasti) sono stati utilizzati per valutare l'espressione dei markers proliferativi p53 Ki-67. E' importante precisare che tutti i prelievi sono stati ottenuti da interventi chirurgici effettuati presso il Dipartimento di Oculistica dell'Ospedale di Cagliari diretto dal Prof. Maurizio Fossarello. In sintesi, nel momento dell'intervento chirurgico, il tessuto viene estratto mediante delle microforbici dall'angolo interno dell'occhio. Di norma, entro un'ora dall'escissione i campioni sono conservati in contenitori sterili contenenti una soluzione preservante (Eurocollins; Roche Biochemicals, Mannheim, Germany) in attesa di essere trasferiti nella camera delle colture per i successivi trattamenti.

La ricerca è stata effettuata in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i pazienti prima che fossero prelevati i campioni di interesse.

Questo studio e tutte le procedure, incluse la biopsia della congiuntiva durante l'intervento di rimozione della cataratta, sono state approvate dal comitato etico dell'Università di Cagliari.

#### *Isolamento dei fibroblasti*

Per l'isolamento dei fibroblasti, i tessuti di pterigio e di congiuntiva sana, sono stati lavati con una soluzione salina (PBS) sterile addizionata con antibiotici e antimicotici e centrifugati per tre volte; inizialmente posti in una piastra sterile, sono stati poi divisi in tre o più parti con un bisturi fino a raggiungere la dimensioni di circa 1mm<sup>2</sup>. Questi frammenti

sono quindi deposti sul fondo di sei diverse piastre sterili e coperti con un vetrino copri-oggetto premendo leggermente sulla superficie in modo che il tessuto aderisse il più possibile al fondo della piastra.

Dopo due ore di adesione si versa delicatamente nella piastra il terreno di coltura rappresentato da tre-quattro ml di DMEM (Gibco Lab. NY, USA) contenente glucosio (4.5g/L ) e addizionato con 10% di siero fetale bovino (FCS, SIGMA), 2mM glutamina, 45mM Na-bicarbonato e una soluzione 1x di antibiotici e antimicotici (Gentamicina e Fungizone). Il giorno successivo, il frammento tessutale si trasferisce in una piastra di coltura di medie dimensioni e quindi dentro un incubatore con 5% CO<sup>2</sup> in una atmosfera umidificata a 37°C.

La piastra di coltura è stata cambiata ogni due giorni. Dopo 5-6, le cellule fibroblastiche iniziano a crescere e si propagano dal frammento fino e riempire quasi completamente la superficie a disposizione, si crea uno strato monolaterale.

La crescita cellulare sovrabbondante è stata morfologicamente consistente, caratterizzata da fibroblasti dalle caratteristiche fusiformi. Dopo la fase di espanto e propagazione in vitro la coltura primaria viene lavata con PBS sterile per due volte e le cellule sono distaccate mediante trattamento con una soluzione di tripsina (tripsina -EDTA- 0.05% / 0.02%) (5.5mg/ml).

Verificato al microscopio che la gran parte delle cellule si sia effettivamente distaccata, la sospensione cellulare viene trasferita in provette contenenti alcuni ml di terreno completo

(per inattivare le tripsina) poi centrifugata a 1000 giri per 5 minuti a temperatura ambiente.

Il pellet cellulare viene recuperato, risospeso in terreno fresco e riseminato in nuove piastre per la propagazione . Un milione di cellule sono state poste in fiasche di coltura di 25 cm<sup>2</sup> fino a raggiungere la confluenza. Nella piastra i fibroblasti saranno poi ulteriormente propagati e utilizzati per gli esperimenti, tenendo conto dei passaggi già sostenuti in vitro.

Durante la propagazione alcune aliquote dei fibroblasti ai primi passaggi in vitro vengono congelate di routine in azoto liquido a una sospensione di 10<sup>7</sup> cellule per ml, tenute come scorta di materiale biologico da cui ripartire in caso di esaurimento replicativo della coltura, di inquinamento o per ripetere alcuni esperimenti. Tutti gli esperimenti sono stati condotti usando fibroblasti che sono stati sottoposti da un minimo di 2 a un massimo di 4 passaggi.

Per gli esperimenti di cinetica “in vitro” le cellule sono state seminate a una densità di 10.000 cellule/cm<sup>2</sup> in piastre da 6 pozzetti e successivamente, per sincronizzarle in uno stato di quiescenza, sono state incubate per 48h in DMEM con FCS allo 0,2%. I fibroblasti quiescenti sono stati poi risospesi in terreno di crescita completo con il 10% di FCS, supplementato o meno con PIO 50µM (Takeda Chemical Industries, Ltd, Osaka ,Japan) e con EVE 20nM (supplied by Novartis Pharma AG, Basel,Switzerland).

Inoltre, ad alcuni campioni di cellule sono stati somministrati i due modulatori del ciclo degli esteri del colesterolo, il PG (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO) alla

concentrazione finale 10 $\mu$ M, e l'inibitore dell'attività dell'ACAT, il SaH (Novartis Pharma AG, Basel), alla concentrazione 4 $\mu$ M.

Le concentrazioni dei farmaci da utilizzare sono state scelte mediante degli esperimenti preliminari che hanno permesso di valutare quali fossero le dosi di farmaco che non presentano tossicità per le cellule, in quanto non ne alteravano la vitalità. Le cellule, dopo il trattamento con i farmaci, sono state prelevate e raccolte nei tempi successivi indicati. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante la conta delle cellule con un emocitometro, mentre la vitalità cellulare è stata monitorata con la colorazione Trypan blue.

*Immunoistochimica: espressione dei markers di proliferazione cellulare (proteine P53 e KI-67)*

L'espressione di due markers proliferativi, le proteine p53 e ki-67 sono state valutate mediante tecniche di colorazione tessutale immunoistochimica. L'antigene è espresso durante le fasi G1, S, G2 e M ma non è espresso durante la fase G0 di quiescenza cellulare.

Dal momento che l'antigene Ki-67 ha una breve emivita, può essere usato come marker di cellule attivamente proliferanti. Il gene p53 codifica invece per una proteina oncosoppressoria espressa ubiquitariamente e coinvolta nel controllo dei processi di replicazione cellulare.

Questo controllo si esplica grazie alle proprietà transattivanti del prodotto del gene p53, che è in grado di legarsi al DNA e di regolare l'espressione di altri geni.

In tal maniera, la proteina p53 inibisce la proliferazione cellulare nelle fasi G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> e M del ciclo cellulare, favorendo la riparazione del DNA.

Se la riparazione cellulare è produttiva, il ciclo cellulare può riprendere e la cellula sopravvive; nel caso invece che il danno sia troppo esteso o irreparabile, la p53 promuove la morte cellulare tramite apoptosi.

L'espressione della p53 mutata, invece, è associata con il decremento della riparazione del DNA, con un aumento delle mutazioni a livello del genoma, con la crescita incontrollata delle cellule affette e contribuisce alla crescita dei tumori.

Le sezioni provenienti da ciascun tessuto di pterigio e congiuntiva sana sono state sottoposte a colorazione immunohistochimica per valutare le anomalie di espressione della proteina p53 usando anticorpi monoclonali murini per la p53 umana (anti-human p53-clone Do -7- Dakocytomation).

Questo anticorpo monoclonale reagisce con un antigene presente nei nuclei delle cellule umane proliferanti ed è in grado di riconoscere sia la proteina p53 che quella mutata, evidenziando l'accumulo di essa, classico reperto delle cellule tumorali.

Tecniche di colorazione immunohistochimica sono state eseguite anche per valutare anomalie di espressione della ki-67 usando anticorpi monoclonali murini per la ki-67 umana (anti-human ki-67 antigen-clone MIB -1-DakoCytomation).

L'espressione della ki-67 è presente, come abbiamo detto, durante le fasi G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M del ciclo cellulare, mentre durante la fase G<sub>0</sub> l'antigene non può essere identificato

Questi anticorpi si sono dimostrati utili per monitorare direttamente la frazione in fase di proliferazione delle cellule normali e di quelle neoplastiche.

### *Saggi analitici*

Per analizzare il comportamento biologico delle nostre cellule nelle diverse condizioni sperimentali e per valutare l'efficacia dei farmaci Pioglitazone, Everolimus, Progesterone e Sandoz nell'inibire la proliferazione cellulare ci serviamo dei seguenti metodi analitici:

- Conta cellulare al microscopio
- Colorazione lipidica
- Metodo di Lowry  
(determinazione quantitativa delle proteine)
- Marcatori radioattivi:  $^3\text{H}$ -timidina,  $^{14}\text{C}$ -oleato,  $^{14}\text{C}$  acetato (valutazione quantitativa delle cellule proliferanti e determinazione quantitativa del colesterolo e degli esteri del colesterolo).

### *Conta cellulare al microscopio*

Per determinare gli effetti dei farmaci sulla proliferazione cellulare, le colture cellulari sono state analizzate al microscopio in intervalli di tempo prestabiliti.

Le conte delle cellule sono state effettuate dopo questi intervalli di incubazione:

- 1) Prima conta cellulare dopo 12 ore dalla semina .
- 2) Seconda conta cellulare dopo 24 ore dalla semina.
- 3) Terza conta cellulare dopo 48 ore dalla semina.
- 4) Quarta conta cellulare dopo 72 ore dalla semina.
- 5) Quinta conta cellulare dopo 96 ore dalla semina.



I fibroblasti, come detto, sono cellule in adesione, quindi come prima cosa è necessario distaccarle dal fondo dei pozzetti utilizzando tripsina, un enzima proteolitico.

Per eseguire la conta cellulare al microscopio è stata utilizzata la camera di Burker.

Si contano le cellule contenute all'interno di tre quadranti e quelle che toccano due lati di ciascun quadrante scelti a caso. Per ottenere il numero di cellule contenute in 1ml di sospensione cellulare si moltiplicano il valore della media delle cellule contate in tre quadranti per  $10^4$  e per il fattore di diluizione. Si considera il volume finale se si vuole ricavare il numero totale di cellule.

#### *Colorazione lipidica cellulare*

La colorazione “oil red o” è comunemente usata per identificare i depositi di lipidi esogeni o endogeni. I fibroblasti sono stati coltivati in una camera di coltura come descritto prima. Dopo i tempi di incubazione indicati, i fibroblasti di congiuntiva sana e pterigio sono stati lavati per 3 volte con PBS e trattati per 10 minuti con formalina calcica al 10%. Una volta avvenuta la fissazione, si rimuove la formalina ed i fibroblasti vengono colorati per 10 minuti con “Oil red O”. I passaggi successivi prevedono una rapida differenziazione in Alcool Isopropilico al 60% per 3-5 secondi, lavaggio in acqua distillata e per finire le cellule vengono contrastate con ematossilina di Mayer (Sigma Aldrich, Germany). Le cellule colorate sono state esaminate al microscopio ottico. L'intensità del rosso, che indica l'accumulo dei lipidi neutri in ogni cellula, è stato

quantizzato con il programma Scion Image (National Institutes of Health Image 1.63 Analysis Software program)

#### *Metodo di lowry*

Un altro indice di proliferazione cellulare è dato dalla quantificazione delle proteine cellulari. Il metodo di lowry è uno dei metodi più sensibili per la determinazione quantitativa delle proteine. Questo si basa sulla colorazione blu che si forma per una combinazione tra la reazione del biureto e la riduzione del reattivo fosfomolibdico –fosfotungstico (reattivo di Folin-Ciocalteu) da parte della tiroxina e del triptofano presenti nelle proteine. Si determina la densità ottica allo spettrofotometro a 750nm contro un bianco. Si costituisce una curva standard con quantità esattamente note di albumina pura, e si risale quindi al contenuto proteico del campione esaminato.

#### *Incorporazione di timidina triziata*

Per una valutazione quantitativa delle cellule proliferanti ci serviamo invece delle timidina triziata ( $^3\text{H}$ -timidina). Le cellule in coltura che si apprestano alla duplicazione utilizzano per la sintesi di DNA la  $^3\text{H}$ -timidina introdotta nel terreno. Quindi le cellule in coltura che hanno incorporato il precursore marcato sono da considerarsi attivamente proliferanti. Nel momento indicato i fibroblasti quiescenti stimolati con FCS al 10% trattati o meno con Pioglitazone (solubilizzato in dimethyl-solfossido, DMSO) o con Everolimus (solubilizzato in etanolo), vengono marcati con timidina triziata (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$ ).

Le cellule sono state incubate per tre ore con 185 KBq/ml di  $^3\text{H}$  timidina (Dupont NeN spec. Act. 248

GBq/mmol). Dopo l'incubazione le cellule così marcate sono state lavate due volte con PBS freddo e quindi messe a contatto con una soluzione di TCA (acido tricloroacetico) che provoca piccole lesioni a livello delle membrane provocando la fuoriuscita della timidina che non è stata incorporata. Successivamente si sospendono le cellule in NaOH che determina la rottura della membrana.

La radioattività è stata misurata con il "beta counter" usando Ecoscint H (Polymed) come liquido di scintillazione. Un'aliquota di idrolizzato è stata utilizzata per valutare il contenuto proteico del campione utilizzando il metodo di Lowry già descritto precedentemente.

#### *Esterificazione del colesterolo*

Per valutare il ruolo del colesterolo e degli esteri del colesterolo nella proliferazione cellulare occorre sapere quanto colesterolo viene sintetizzato, e poi quanto viene esterificato durante il processo proliferativo. Per questo scopo utilizziamo due metodiche che si avvalgono di due marcatori radioattivi: il  $^{14}\text{C}$ -acetato e il  $^{14}\text{C}$ -oleato. L'acetato è il precursore del colesterolo, infatti ad opera dell'enzima HMG-CoA riduttasi esso viene convertito in un composto isoprenoide (il mevalonato). Questa è la prima tappa che porta da prima alla formazione dello squalene, poi alla sua ciclizzazione e trasformazione in colesterolo.

Le cellule in proliferazione assumono il  $^{14}\text{C}$ -oleato presente nel terreno di coltura per la sintesi del colesterolo. Per preparare il composto radioattivo è necessario aggiungere  $100\mu\text{Ci}$  di  $^{14}\text{C}$ -oleato in etanolo (Dupont, NEN  $55\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ )

legato ad albumina di siero bovino (BSA, Sigma) e 1.4 mg di KOH. Dopo l'evaporazione dell'etanolo è stato aggiunto un buffer potassio fosfato (PBS) senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , contenente 4.24mg di BSA (acidi grassi essenziali liberi, Sigma) la miscela così ottenuta è stata vigorosamente vorticata. Questa soluzione è stata aggiunta in maniera sistematica e precisa ad ogni pozzetto a una concentrazione finale di 2  $\mu\text{Ci/ml}$ .

L'oleato è un acido grasso che all'interno della cellula viene utilizzato nell'esterificazione del colesterolo libero.

L'introduzione nel terreno di coltura dell'oleato avente  $^{14}\text{C}$  comporta la sua internalizzazione da parte delle cellule.

Le cellule così marcate, dopo una incubazione di 5 ore, sono state lavate con PBS e successivamente portate in sospensione con un'azione meccanica sulla superficie di adesione e raccolte in provette. Queste vengono centrifugate decantate e il pellet si risospende nell'acetone che fa precipitare le proteine mentre i lipidi rimangono in sospensione in quanto solubili in esso. L'acetone contenente i lipidi viene essiccato e i lipidi vengono risospesi in una soluzione di cloroformio per poter essere stratificati su gel di silice (Merk, Germania). Per la separazione con la metodica TLC (cromatografia su strato sottile) abbiamo utilizzato un sistema di eluizione contenente n-eptano etere isopropilico/acido formico (60:40:2).

Alla fine della corsa cromatografica dopo aver fatto asciugare le piastre, i lipidi neutri sono stati identificati mediante esposizione ai vapori di iodio. Le bande del colesterolo libero e degli esteri del colesterolo, identificate mediante il controllo con gli standard stratificati su una parte

della piastra sono state rimosse è l'incorporazione di  $^{14}\text{C}$  acetato nelle varie frazioni misurata al "beta counter".

### *Efflusso del colesterolo*

Per gli esperimenti sull'efflusso del colesterolo le cellule sono state fatte crescere fino a raggiungere una confluenza del 100% prima dell'inizio degli esperimenti. Per marcare il colesterolo cellulare, le colture sono state incubate in un siero contenente terreno con  $^3\text{H}$ -Colesterolo (radioattività specifica di 1.81 TBq/mmol, radioattività finale di 74 KBq/ml; Amersham Biosciences) per 12 ore in un incubatore a  $\text{CO}_2$ . Dopo la marcatura, le cellule sono state lavate per 6 volte con PBS e incubate per altre 12 ore e 24 ore in FBS al 10%. Dopo aver separato il terreno dalla frazione cellulare mediante aspirazione della parte liquida le cellule sono state grattate usando uno scraper cellulare e messe in 2 ml di acetone freddo. Il terreno invece, è stato centrifugato a 15000 giri per 15 minuti per eliminare i residui. L'efflusso del colesterolo è espresso in percentuale di colesterolo marcato trasferito dalle cellule al terreno. L'efflusso del colesterolo è stato misurato applicando la formula:

$$\text{EFFLUSSO} = \frac{\text{radioattività nel terreno}}{[\text{Radioattività nel terreno} + \text{radioattività nelle cellule}]}$$

### ***Analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR.***

I livelli di espressione dell'mRNA dell'ACAT1, dell'MDR1, dell'nCEH e dell'ABCA1 sono stati studiati sia nei PFs sia nei NCFs mediante RT-PCR semiquantitativa utilizzando l'mRNA dell'actina come controllo. L'RNA totale è stato estratto da una quantità totale di circa  $10^6$  cellule prelevate dai campioni trattati con i farmaci e da quelli non trattati. L'estrazione è stata effettuata utilizzando il reagente TRIZOL (TRIZOL Reagent, Invitrogen) una miscela di fenolo e guanidina isotiocianato, il quale mantiene integro l'RNA mentre lisa le cellule e dissolve i componenti cellulari.

Successivamente le stesse concentrazioni di RNA (1 $\mu$ g) per ciascun campione, sono state retroscritte in cDNA utilizzando il metodo random examer.

I cDNA così ottenuto è stato successivamente amplificato mediante PCR con primers specifici secondo i protocolli forniti dalla casa produttrice (GeneAmp RNA PCR Kit, Perkin-Elmer Cetus).

La PCR è stata messa a punto utilizzando i seguenti primers e le relative condizioni di reazione:

Gene target	Primer PCR	Protocollo PCR	Dimensione del prodotto PCR (pb)
<b>ABCA1</b>	5' TCCTCTCCCAGAGCAAAAA 3' 5' CTCCACAACACTTCACATGGT 3'	95°C-30 s 62°C-60 s 72°C-30 s (30 cicli)	286
<b>ACAT 1</b>	5' AGCAGAGGCAGAGGAATTGA 3' 5' GCACACCTGGCAAGATGGAG 3'	95°C-30s 58°C-50s 72°C-60s (40 cicli)	466
<b>MDR 1</b>	5' CCCATCATTGCAATAGCAGG 3' 5' GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA 3'	94°C-30s 55°C-60s 72°C-60s (30 cicli)	167
<b>β-ACTINA</b>	5' AGGGGCCGGACTCGTCATACT3' 5' GGCGGCACCACCATGTACCCT 3'	96°C-30s 60°C-59s 72°C-45s (30 cicli)	202
<b>nCEH</b>	5' CTTGTAAACTTGAGTTGGAG 3' 5' GTAGGAAGTAACCACATTCA 3'	94°C-30s 55°C-60s 72°C-60s (30 cicli)	151

Le concentrazioni di cDNA al di sotto del livello di saturazione necessarie per ottenere delle quantità dei prodotti di PCR proporzionali a quelle iniziali del campione, sono state individuate in esperimenti preliminari condotti per testare un dato intervallo di concentrazioni note del templatò iniziale. Le successive reazioni di PCR sono state eseguite con le concentrazioni di templatò al di sotto di quella di saturazione con le stesse condizioni di reazione.

### ***Blotting dei prodotti PCR***

Durante la reazione di PCR è stato introdotto un desossinucleotide marcato, l'11-dUTP coniugato con la Digossigenina, una molecola non radioattiva (DIG; Boheringer Mannheim) che, una volta incorporata nel prodotto di PCR, è stata evidenziata mediante reazione con frammenti Fab di anticorpi anti-digossigenina coniugati con una fosfatasi alcalina e visualizzati con il substrato chemiluminescente CSPD.

La defosforilazione enzimatica del CSPD mediante la fosfatasi alcalina produce un'emissione di luce ad una lunghezza d'onda di 477nm che impressiona le lastre radiografiche. I frammenti di DNA sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio e successivamente trasferiti su una membrana di nylon tramite incubazione per 16 ore in una soluzione di ibridazione 10X SSC. La membrana sulla quale sono stati trasferiti i frammenti ottenuti mediante la PCR è stata esposta su una lastra per autoradiografia per un intervallo tra i 2-10 minuti.

L'intensità delle bande degli autoradiogrammi è stata misurata mediante il software Kodak Digital Science Band Scanner Image Analysis System comprendente l'HP Scanjet, ID Image



Analysis. L'intera procedura è stata standardizzata esprimendo la concentrazione del prodotto di PCR per ognuno degli mRNA bersaglio confrontato con la concentrazione del prodotto ottenuto per la  $\beta$ -Actina. Poiché spesso si ottengono dei prodotti di PCR a bassa concentrazione quando i segmenti di cDNA sono coamplificati nello stesso tubo di reazione con un gene standard di controllo interno, i livelli relativi dell'espressione genica sono stati determinati confrontando i prodotti di PCR del cDNA bersaglio e quelli del gene per la  $\beta$ -Actina processati in tubi di reazione diversi.

***Analisi dell'espressione proteica mediante Western blotting.***

Le cellule risospese in Ripa Buffer (10% SDS in 50 $\mu$ M tris, 150 $\mu$ M EDTA, pH 7.5, 50 $\mu$ M DTT, addizionato con un inibitore delle proteasi) sono state lisate mediante incubazione a 37° e ripetuti passaggi attraverso un ago 22-gauge. La concentrazione proteica del lisato ottenuto è stata determinata mediante il kit BCA (Sigma Bicinchoninic Acid). Successivamente i campioni di proteine (50 $\mu$ g) sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilamide al 12% in SDS (sodium dodecyl sulfate, SDS-PAGE). Le proteine così separate sono state successivamente trasferite su una membrana in PVDF (polyvinylidene Fluoride, invitrogen).

La membrana è stata saturata (blocking) con una soluzione di TBST (tris-Buffered Saline Tween-20) con il 5% di latte a temperatura ambiente per 1.5 h (50 $\mu$ M Tris-HCL pH 7.6, 0.15M NaCl e Tween-20 allo 0.05%) e quindi incubata per 1.5 h con l'anticorpo primario anti-ACAT1 H-125 e anticaveolina 1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) risospesi nella stessa soluzione di TBST usata per il blocking. La fase successiva consisteva nell'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con la

perossidasi (horseradish peroxidase, HRP, Santa Cruz Biotechnology, CA) per un'altra ora e mezza. La membrana è stata poi lavata accuratamente con TBST 1x (50 $\mu$ M tris-HCL, ph 7.6 e 0.15 M NaCl) Le bande immunoreattive sono state poi visualizzate mediante il reagente di rivelazione ECL (Enhanced Chemiluminescence Reaction, Amersham).

Tabella II.2 Anticorpi e parametri del Western Blotting

Proteina target	% gel	Anticorpo 1°	Diluizione Anticorpo 1°	Incubazione Anticorpo 1°	Diluizione Anticorpo 2°	Incubazione Anticorpo 2°
<b>ACAT-1</b>	12	Rabbit Polyclonal	1:5000	1.5 ore /4°C	1:3000	1.5 ore/T.A.
<b>Caveolin-1</b>	12	Mouse monoclonal	1:5000	1.5 ore /4°C	1:1000	1.5 ore/T.A.
<b>β-Actina</b>	12	Goat Polyclonal	1:1000	48 ore/4°C	1:1000	1.5 ore/T.A.

### *Analisi statistica*

I dati ottenuti riguardano i fibroblasti di congiuntiva sana e di pterigio provenienti dai pazienti secondo le modalità già descritte. I risultati presentati sono la media  $\pm$  SE dei valori ottenuti in triplicato.

Il test t di Student è stato utilizzato per determinare differenze significative fra i gruppi di controllo e quelli trattati.

Per tutte le analisi statistiche i livelli di significatività sono stati settati a  $P < 0.05$ .

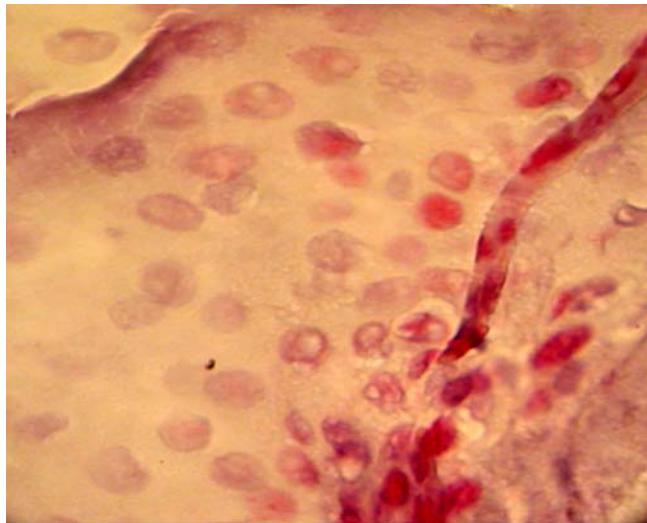
***Attività proliferativa nei tessuti di pterigio e congiuntiva sana.***

Basandosi sulla nozione che l'antigene Ki-67 e l'espressione della p53 mutata sono molto usate come markers di cellule attivamente proliferanti, abbiamo valutato l'espressione della p53 e della KI67 in pterigio umano usando anticorpi monoclonali murini per la p53 umana (clone DO-7) o anticorpi monoclonali murini per la Ki-67 umana (clone mib-1). Come mostrato nella fig. 4 nella pagina successiva, l'immunocolorazione positiva (il nucleo è colorato di rosso) per la p53 (A) e la ki-67 (B) ha trovato riscontro in tutti e quattro i tessuti di pterigio esaminati, suggerendo la presenza di un'elevata attività proliferativa nello pterigio oculare.

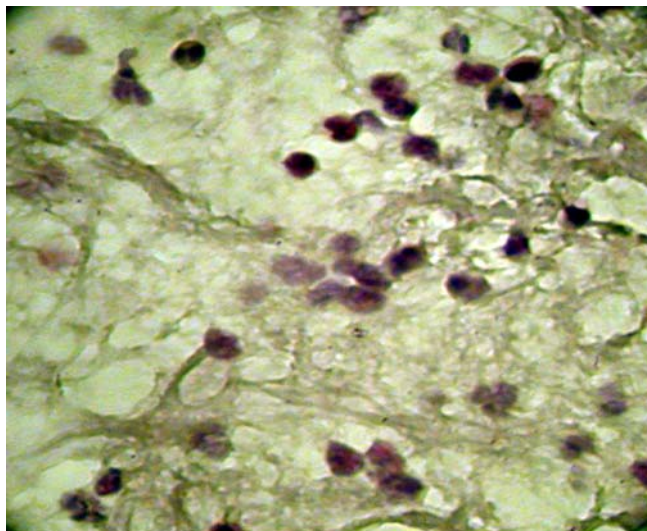
Inoltre, è stata osservata un'assenza di positività dei nuclei nei tessuti di congiuntiva normale (dato non mostrato).

Fig 4: Sezione di tessuto di pterigio trattato con anticorpi monoclonali: (A) Ki-67, Mib 1.(B) anti p53 DO-7. Come colorazione di contrasto è stata utilizzata l'Ematossilina, le cellule sono evidenziate in entrambi i casi con una colorazione nucleare rossa.

A



B

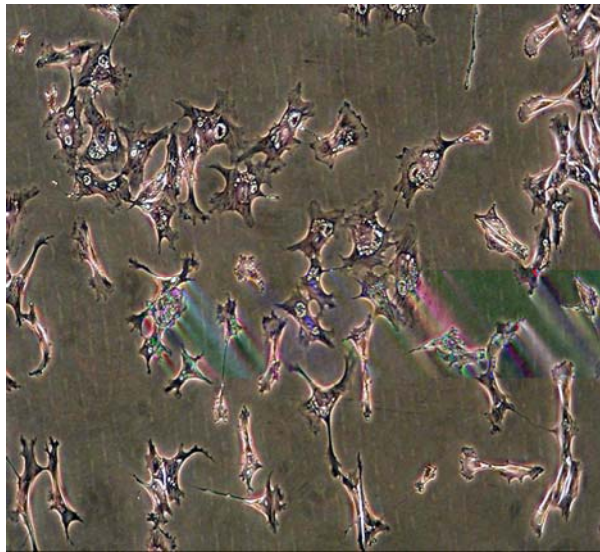


### ***Accumulo di lipidi in fibroblasti di pterigio***

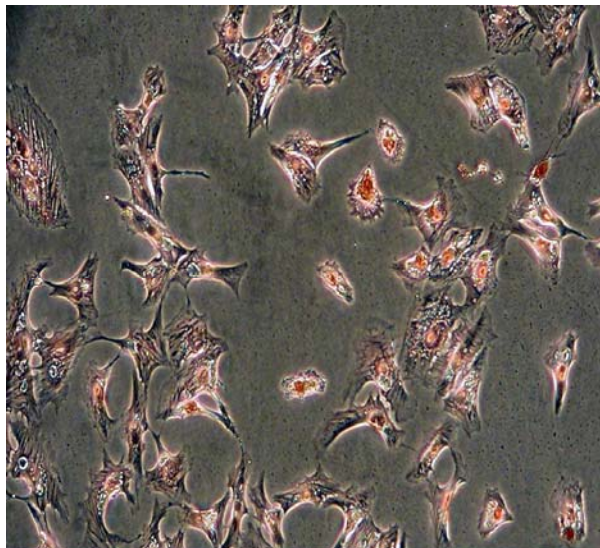
Per determinare se un'alterata crescita cellulare possa essere associata ad alterazioni nel metabolismo intracellulare dei lipidi si è preceduto a evidenziare in colture primarie di fibroblasti di pterigio e congiuntiva sana i depositi intracellulari degli esteri del colesterolo. Dopo l'isolamento dai tessuti oculari, i fibroblasti sono stati colorati con ematossilina (che colora i nuclei) e con oil red O (che colora i lipidi). Come mostrato nella figura 5 nella pagina seguente, nella congiuntiva sana si evidenzia solo la colorazione nucleare (A), mentre nei fibroblasti di pterigio si osservano numerose gocce lipidiche (lipid droplets) nel citosol cellulare (figura 5B, in rosso), segno evidente del differente metabolismo lipidico esistente tra i due gruppi cellulari. Le differenze tra PFs e NCFs ( $P < 0.05$ ) erano statisticamente significative.

FIG 5: Differenza di accumulo di lipidi tra fibroblasti di congiuntiva sana e di pterigio. Nessuna positività all'Oil red O è stata osservata nei fibroblasti sani (A) mentre le cellule di pterigio mostravano un'intensa positività (B).

A



B



### ***Esterificazione ed efflusso del colesterolo nei fibroblasti***

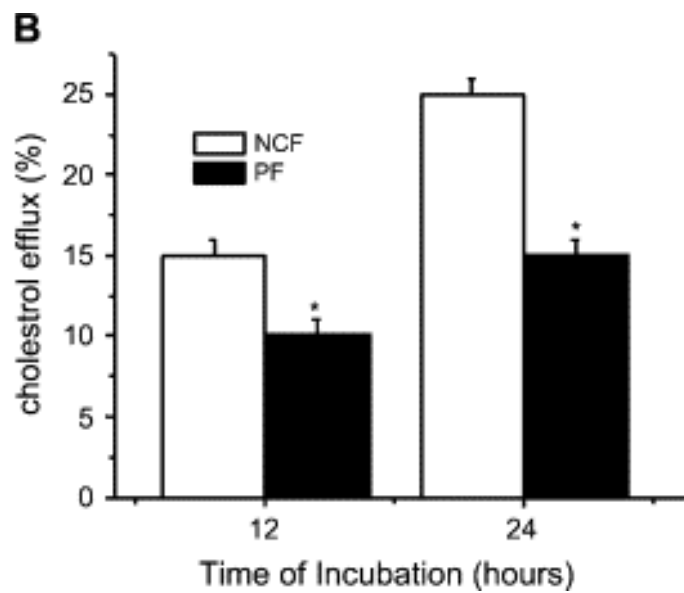
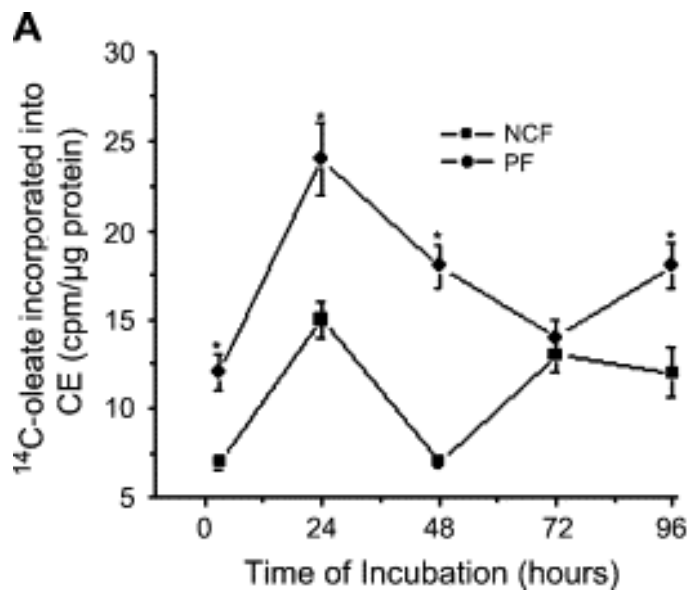
Le modificazioni tempo-dipendenti dell'esterificazione del colesterolo (misurate attraverso l'incorporazione di  $^{14}\text{C}$  oleato) nelle cellule quiescenti e nelle cellule in crescita di fibroblasti di pterigio e di congiuntiva sana, sono fortemente incrementate 24h dopo la stimolazione nei due tipi di fibroblasti. Tuttavia, la velocità di incorporazione dell'acido oleico  $^{14}\text{C}$  all'interno degli esteri del colesterolo è risultata molto più bassa nei fibroblasti di congiuntiva sana rispetto ai fibroblasti di pterigio ( $p < 0.05$ ) considerando tutte le fasi temporali tranne per le 72h (Fig.6A).

Inoltre per valutare se le differenze osservate nell'esterificazione del colesterolo, possono essere attribuite alle differenze nell'efflusso intracellulare di colesterolo, abbiamo misurato anche la percentuale di  $^3\text{H}$  colesterolo, trasferita dalle cellule al terreno. L'efflusso dei fibroblasti di congiuntiva sana era superiore del 40% alle 12 ore e superiore dell'80% alle 24 ore rispetto all'efflusso dei fibroblasti di pterigio ( Fig 6B)



**Fig. 6:** Risultati relativi all'esterificazione (A) e all'efflusso (B) del colesterolo nei fibroblasti di pterigio e in quelli sani.

\* P < 0.05



## ***Effetti dei farmaci antiproliferativi sui fibroblasti di pterigio***

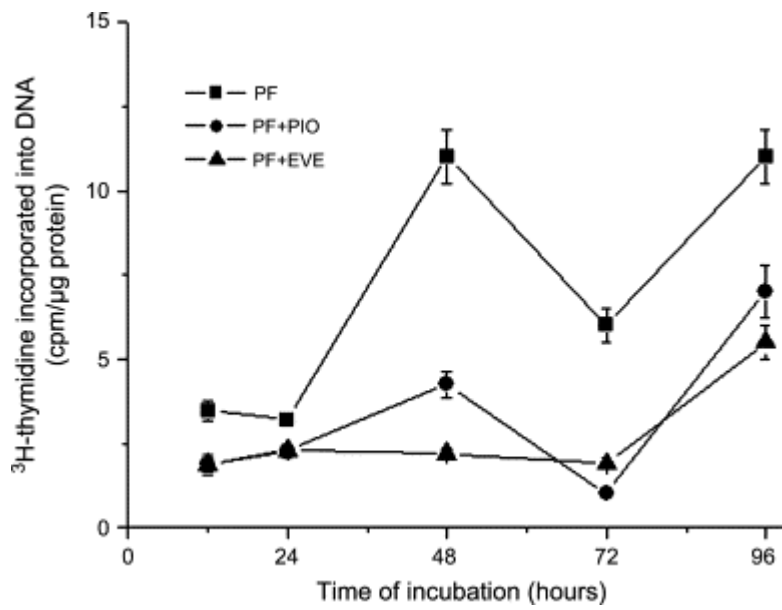
### *Effetti antiproliferativi*

Gli effetti del Pioglitazone e dell'Everolimus sulla proliferazione di fibroblasti di pterigio sono stati valutati misurando l'incorporazione di <sup>3</sup>H timidina del DNA in cellule incubate con 10% FBS.

Il Pioglitazone e L'Everolimus inibiscono l'incorporazione di timidina nei fibroblasti di pterigio stimolati al tempo 0 (all'inizio) e dopo 48 ore dalla stimolazione (Fig. 7, pagina successiva).

In questi esperimenti, la vitalità cellulare (valutata con il Trypan blu), è stata maggiore del 95% suggerendo che l'effetto inibitorio dei due farmaci è dovuto ad un blocco della crescita piuttosto che a morte cellulare. Questi risultati indicano chiaramente che questi due farmaci esercitano un'attività anti-proliferativa anche nei fibroblasti di pterigio.

**Fig 7:** Effetto del Pioglitazone (PIO) e dell'Everolimus (EVE) sulla proliferazione dei fibroblasti.



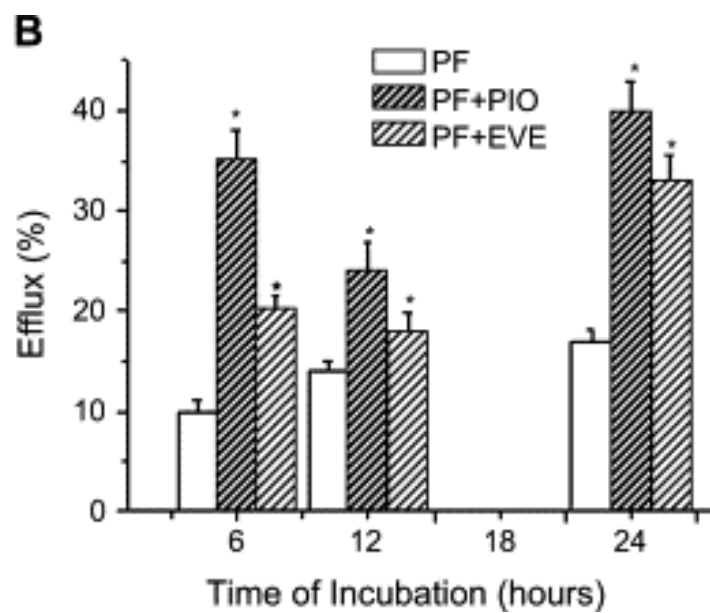
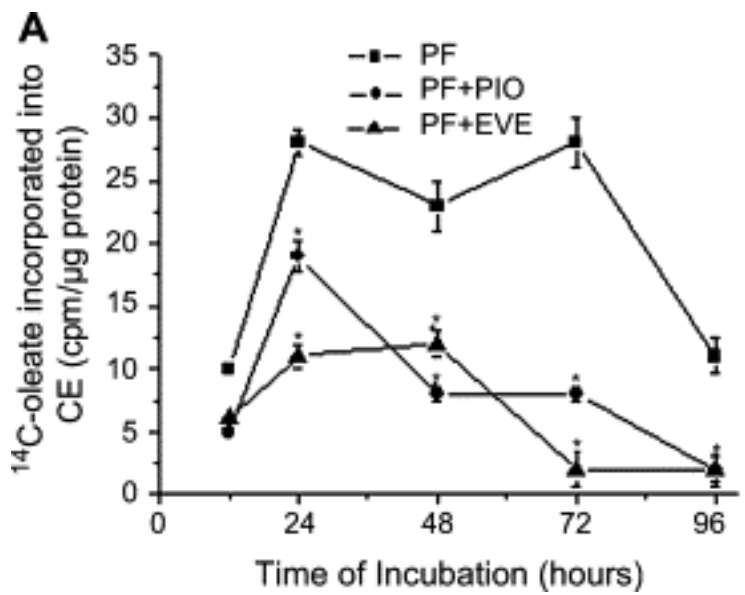
### *Effetti sul colesterolo*

L'attività dei farmaci sull'esterificazione del colesterolo è stata valutata mediante l'incorporazione di  $^{14}\text{C}$ -oleato in esteri del colesterolo mentre gli effetti sull'efflusso sono stati valutati attraverso la misura del  $^3\text{H}$  colesterolo nelle cellule e nel terreno.

La Fig. 8A mostra come l'inibizione proliferativa operata dai due farmaci è preceduta temporalmente da un rallentamento dell'esterificazione, infatti l'abbassamento dei valori di incorporazione di  $^{14}\text{C}$ -oleato negli esteri del colesterolo anticipano di almeno 12 ore l'effetto antiproliferativo esercitato dai due farmaci (Fig. 8A). L'inibizione dell'esterificazione del colesterolo è associata ad un aumento dell'efflusso (Fig. 8B). Questi risultati indicano che l'effetto antiproliferativo dei due farmaci potrebbe essere mediato (almeno in parte) da variazioni del metabolismo intracellulare del colesterolo.

**Fig. 8:** Risultati relativi all'incorporazione di  $^{14}\text{C}$ -oleato (A) e all'efflusso del colesterolo nei fibroblasti di pterigio (B).

\*  $P < 0.05$ .

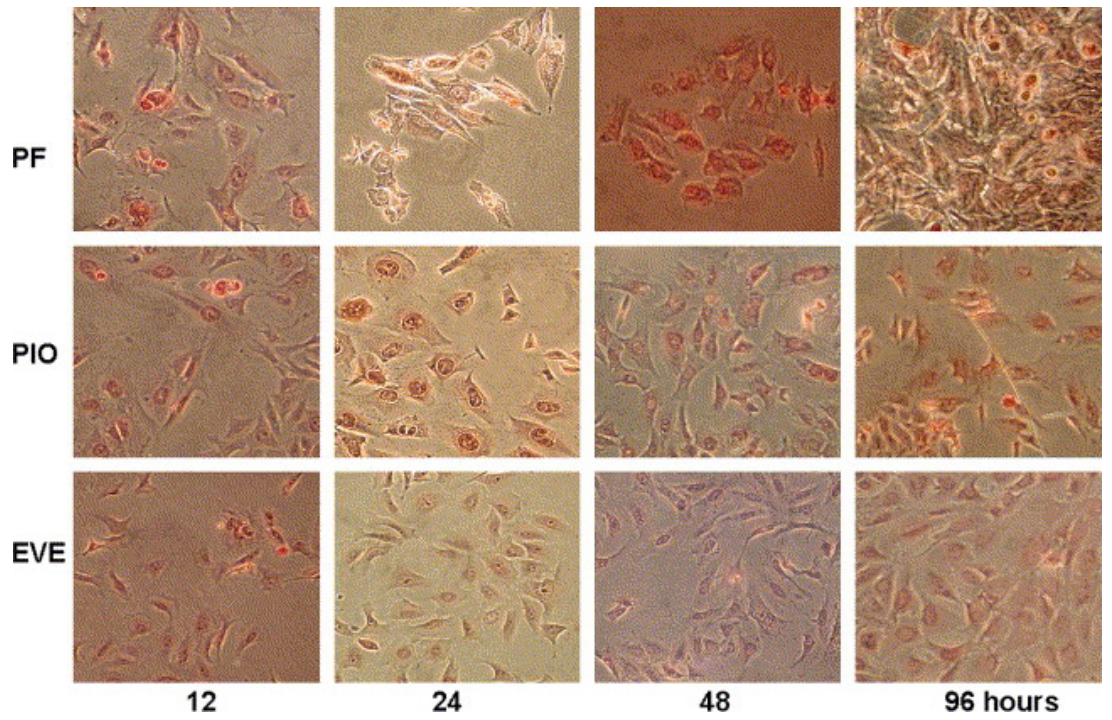


### *Effetti dei farmaci antiproliferativi sull'accumulo di lipidi*

Per dimostrare l'attività antiproliferativa dei farmaci sull'accumulo di lipidi in fibroblasti di pterigio trattati e non, i fibroblasti di pterigio sono stati sottoposti alla colorazione con "Oil red o" come descritto nei materiali e metodi.

Dalla Fig 9, si evince che l'accumulo di gocce lipidiche valutata nelle 12-24-48-96h successive al trattamento con i farmaci, è più evidente nei fibroblasti di pterigio non trattati con il PIO e L'EVE.

**Fig. 9:** Accumulo lipidico valutato per 96 ore nei fibroblasti di pterigio trattati e non con i farmaci antiproliferativi.



***I farmaci antiproliferativi riducono la velocità di crescita dei fibroblasti di pterigio modulando l'omeostasi del colesterolo.***

*Determinazione dell'espressione genica e proteica delle principali proteine del metabolismo del colesterolo.*

La dimostrazione che la proliferazione dei fibroblasti isolati da colture primarie di pterigio era associata con un aumento dell'esterificazione del colesterolo suggeriva che, nello sviluppo e nella progressione di questa malattia, potesse essere coinvolta un'alterazione dell'omeostasi del colesterolo.

Per determinare se farmaci antiproliferativi come il Pioglitazone (PIO) e l'Everolimus (EVE) potessero inibire le proteine coinvolte nel ciclo di esterificazione del colesterolo e nella proliferazione dei fibroblasti di pterigio (PFs), sono stati pianificati degli ulteriori esperimenti. Infatti, questi farmaci potrebbero rappresentare una medicazione a livello topico per prevenire ed inibire la crescita dello pterigio allo stadio precoce, probabilmente modulando il metabolismo degli esteri del colesterolo.

Molto verosimilmente, le modificazioni intracellulari dell'omeostasi del colesterolo svolgono un ruolo rilevante nell'insorgenza dello pterigio. Alcune molecole chiave coinvolte nella regolazione dell'omeostasi intracellulare del colesterolo e le proteine che ne mediano l'efflusso, potrebbero dunque essere coinvolte nella fase proliferativa di questa patologia.



Queste molecole sono :

1) l'ACAT, (acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase), enzima responsabile della formazione degli esteri del colesterolo a livello intracellulare;

2) La Pgp-MDR1, (multidrug resistance protein), implicata nel trasporto del colesterolo dalla membrana plasmatica al reticolo endoplasmatico (ER);

3) La caveolina-1, la proteina chiave strutturale delle caveole, un probabile carrier dell'eccesso di colesterolo dal ER alle caveole della membrana plasmatica.

4) l'nCEH (neutral cholesterol ester hydrolase), l'enzima responsabile dell'idrolisi degli esteri del colesterolo;

5) L'ABCA1 (ATP binding cassette- A1), una proteina che regola l'efflusso di colesterolo e determina la formazione delle HDL.

Infatti, è stato dimostrato che, durante la fase proliferativa di alcuni tipi di tumore, aumenta in modo rilevante l'espressione dell' ACAT1 e dell' MDR1(Threlfall et al 1999) mentre risulta inibita l'espressione dell'nCEH, dell'ABCA1 e della caveolina-1 (Tan,lim 1997; Coroneo, Di Girolamo 1999; Clear, Chirambo1979).

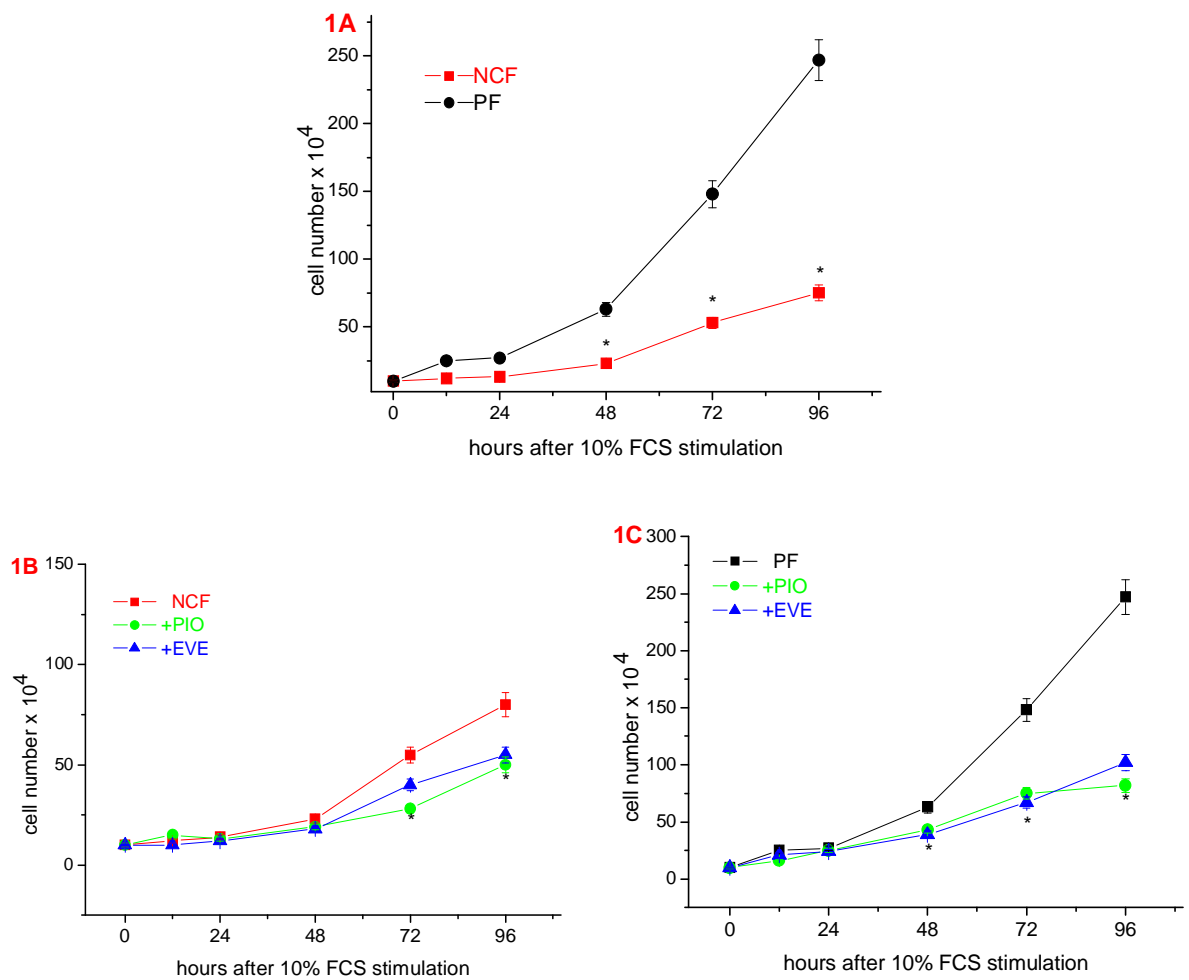
In seguito ai risultati ottenuti nei nostri studi precedenti abbiamo quindi ritenuto che fosse utile esplorare se un'alterata espressione delle suddette proteine potesse svolgere un ruolo nella stimolazione della crescita delle cellule, una fase essenziale nella progressione e nelle recidive dello pterigio.

## ***Risultati***

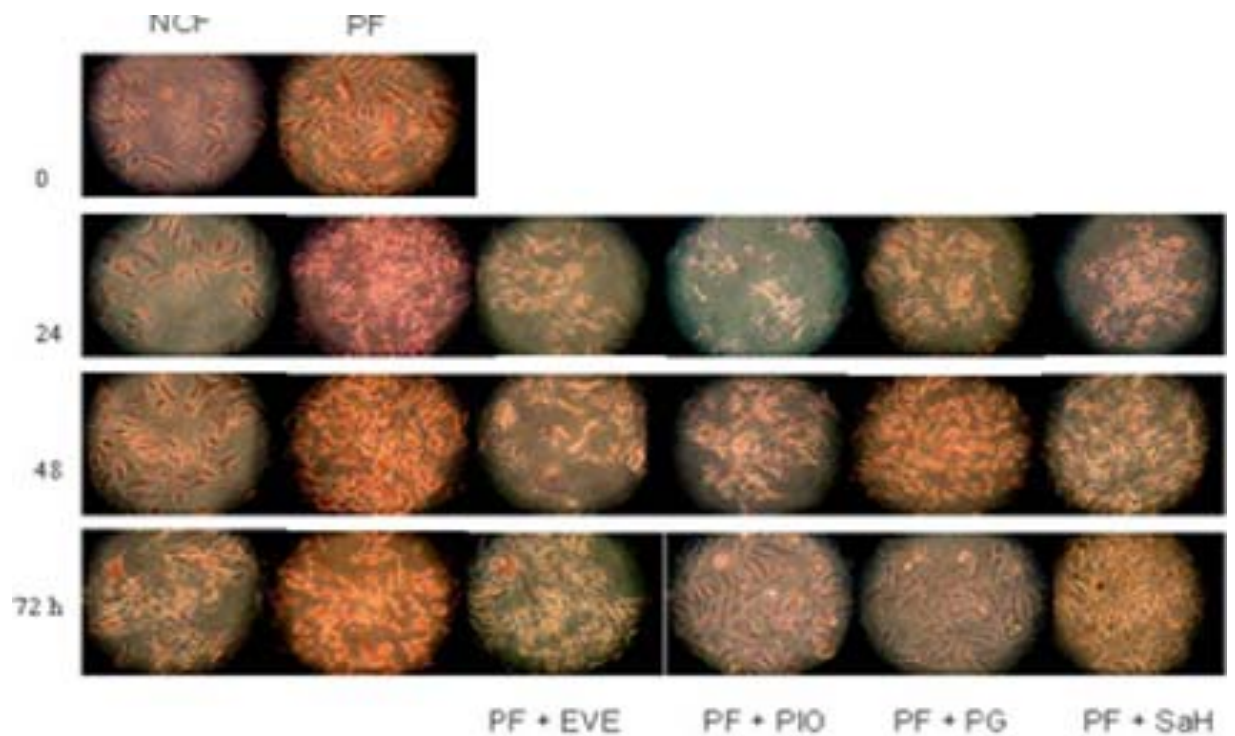
### *Effetti del Pio e dell'EVE sulla proliferazione cellulare e sull'accumulo di lipidi neutri nei fibroblasti di pterigio.*

In questo esperimento abbiamo valutato gli effetti dei farmaci PIO ed EVE sulla proliferazione dei PFs e degli NCFs mediante la conta del numero di cellule incubate con il 10% FCS. La stimolazione dei PFs con FCS al 10% determina un aumento significativo del numero di cellule rispetto agli NFCS (Fig. 10A, nella pagina seguente,  $P < 0.05$ ).

La somministrazione dei farmaci inibitori della proliferazione determina, soprattutto, una significativa inibizione della proliferazione delle cellule PFs (Fig, 10B, 10C,  $P < 0.05$ ). Inoltre, questi farmaci si sono dimostrati efficaci nel ridurre l'accumulo di lipidi neutri in modo simile rispetto agli inibitori specifici dell'esterificazione del colesterolo PG e SaH (Fig. 11A, 11B ).

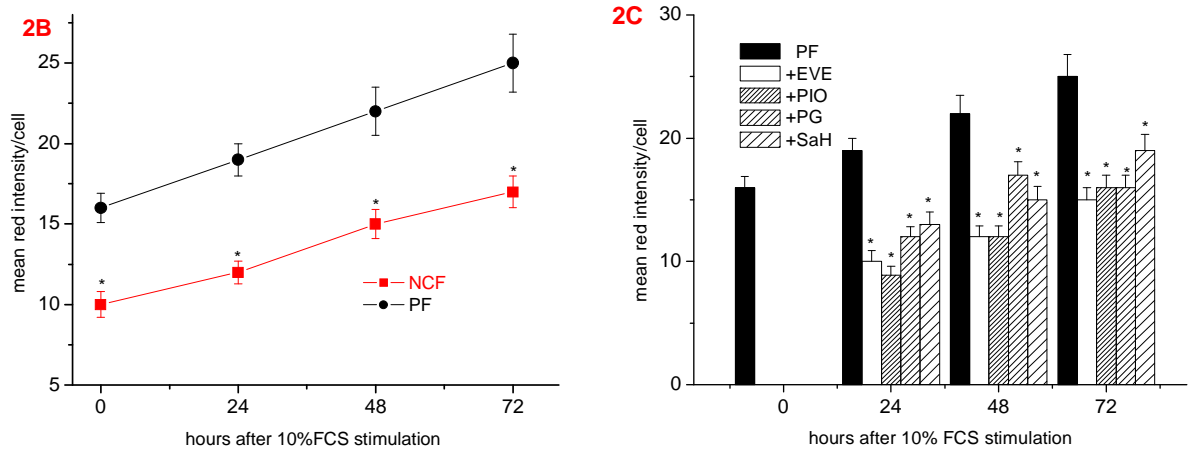


**Fig.10:** La stimolazione delle cellule di PFs con FCS al 10% determina un aumento significativo del numero di cellule in confronto ai NCFs (A,  $p < 0.05$ ); In B e C, effetti della somministrazione dei farmaci inibitori PIO ed EVE rispettivamente nei campioni NCFs e PFs. Come si vede in C, la proliferazione dei PFs è fortemente inibita. I dati mostrati rappresentano la media  $\pm$  SE dei risultati ottenuti in esperimenti condotti in triplicato. \*  $P < 0.05$ .



**Fig.11 (A): Effetti dei farmaci PIO, EVE, PG e SaH sull'accumulo di lipidi intracellulari in cellule PFs stimolate in coltura con il 10% di FCS.**

Le cellule sono state incubate da 0a 72 ore sia in presenza che in assenza dei suddetti farmaci. Le cellule una volta fissate sono state colorate con l'oil red O per evidenziare i lipidi neutri, usando come colorante per i nuclei l'emetossilina. (Nella prima e nella seconda colonna sono rappresentati i campioni in assenza di trattamento con i farmaci ) In questa figura sono mostrati i risultati corrispondenti ad un campione proveniente da un individuo di controllo e di un paziente affetto da pterigio (dalla terza alla sesta colonna sono rappresentati i PFs trattati con i diversi farmaci, come indicato) Risultati simili sono stati ottenuti in cellule NCFs e PFs provenienti da altri 10 donatori ( in totale sei pazienti e sei controlli). PFs, Pterygium fibroblasts, fibroblasti di pterigio; NSF, Normal conjunctival fibroblasts, fibroblasti di congiuntiva normale. Pio, Pioglitazone; EVE, Everolimus ; PG, Progesterone; SaH, Sandoz.



**Fig. 11 (B,C): Accumulo lipidico valutato mediante la quantizzazione della colorazione con "Oil red O" alle 0-24-48-72h.**

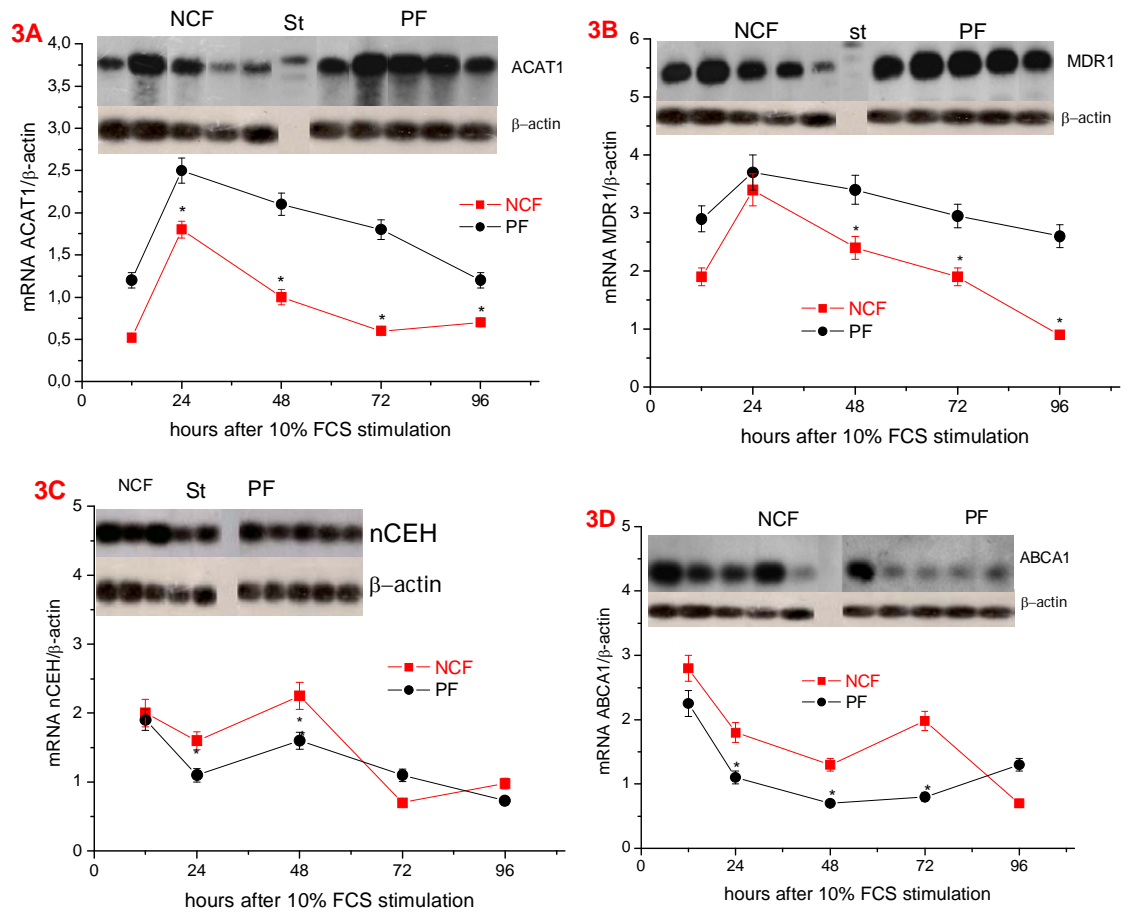
In **B**, aumento dell'accumulo degli esteri del colesterolo nei PFs rispetto ai NCFs dopo stimolazione con FCS al 10%. In **C**, quantificazione degli esteri accumulati nelle cellule PFs dopo trattamento con i farmaci inibitori della proliferazione (PIO ed EVE) e con gli inibitori specifici dell'esterificazione del colesterolo (PG e SAH). Entrambe le classi di farmaci si dimostrano ugualmente efficaci nel ridurre l'accumulo degli esteri. \*P<0.05.

PFs, Pterygium fibroblasts, fibroblasti di pterigio; NCFs, Normal conjunctival fibroblast, fibroblasti di congiuntiva normale.

PIO, Pioglitazone; EVE, Everolimus; PG, Progesterone; SaH, Sandoz.

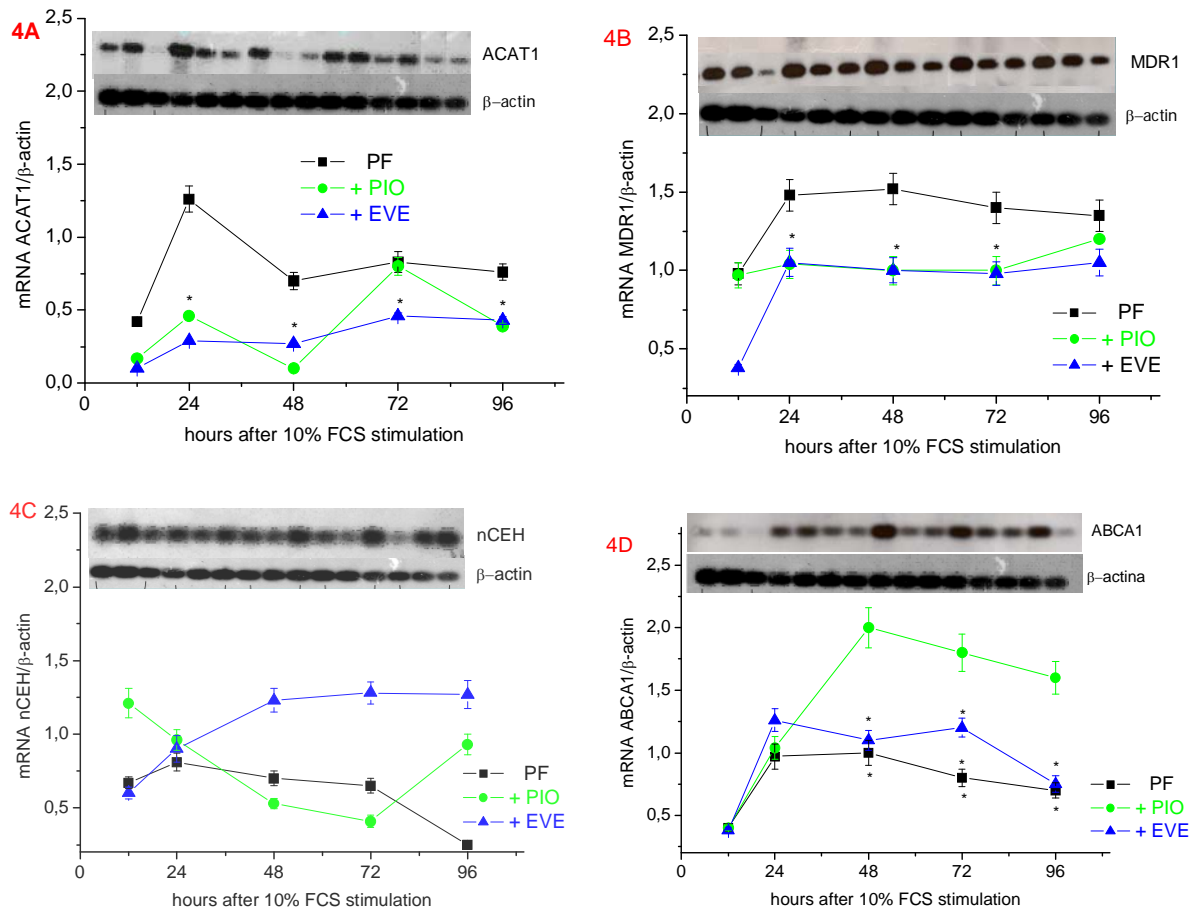
***Espressione delle principali proteine coinvolte nel ciclo degli esteri del colesterolo durante la fase proliferativa dei fibroblasti di congiuntiva normale (NCFs) e dei fibroblasti di pterigio (PFs).***

Per determinare se la proliferazione dei fibroblasti fosse o meno associata a modificazioni dell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo le cellule quiescenti, sia NCFs che PFs, sono state stimulate con terreno al 10% di FCS. Come mostrato nella Fig.12A e B, i livelli di mRNA dei geni ACAT1 e MDR1 risultano significativamente aumentati dopo 24h dalla stimolazione, sia nelle cellule NCFs che in quelle PFs, anche se i livelli di espressione nelle cellule PFs, considerati nello stesso intervallo di tempo, erano significativamente più alti in confronto a quelli delle NCFs. Al contrario, nelle cellule PFs rispetto alle NCFs, i livelli di espressione dell'mRNA dei geni nCEH e ABCA1 risultavano più bassi. (vedi Fig. 12, pannelli C e D)



**Fig.12:** Livelli di espressione dell'mRNA delle proteine coinvolte nel ciclo di esterificazione del colesterolo durante la fase di proliferazione delle cellule NCFs e PFs. I NCFs ed i PFs sono stati mantenuti in condizioni controllate. L'mRNA totale è stato estratto dopo 12, 24, 48, 72 e 96 ore dalla stimolazione con il 10% di FCS successivamente analizzato mediante RT-PCR semi-quantitativa.

Nelle reazioni utilizzate come controllo negativo, in cui mancava il campione di mRNA, la coppia di primers o il template di cDNA non si osservava nessun prodotto di PCR (dati non mostrati). I grafici rappresentano le medie  $\pm$  SE dei risultati ottenuti in esperimenti condotti in triplicato dopo standardizzazione con l'espressione della b-Actina. Risultati simili sono stati ottenuti con le cellule NCFs e PFs provenienti da altri dieci donatori (in totale sei controlli e sei pazienti). \*  $P < 0.05$ .



**Fig. 13:** Effetti del trattamento con i farmaci PIO ed EVE sui livelli di espressione dell'mRNA di proteine coinvolte nel ciclo di esterificazione del colesterolo durante la proliferazione delle cellule PFs. Le cellule PFs sono state messe in coltura in condizioni controllate e trattate con i farmaci PIO o EVE. L'RNA totale è stato estratto dopo 12, 24, 48, 72 e 96 ore ed analizzati mediante RT-PCR. Nelle reazioni utilizzate come controllo negativo, in cui manca il campione di mRNA, la coppia di primers o il template di cDNA non si osservava nessun prodotto di PCR. I farmaci PIO ed EVE hanno determinato una riduzione dei livelli di espressione dell'mRNA dei geni ACAT1 ed MDR1 (A e B), mentre si è osservato un aumento dell'espressione genica per l'nCEH e l'ABCA1 (C e D). \*P<0.05.

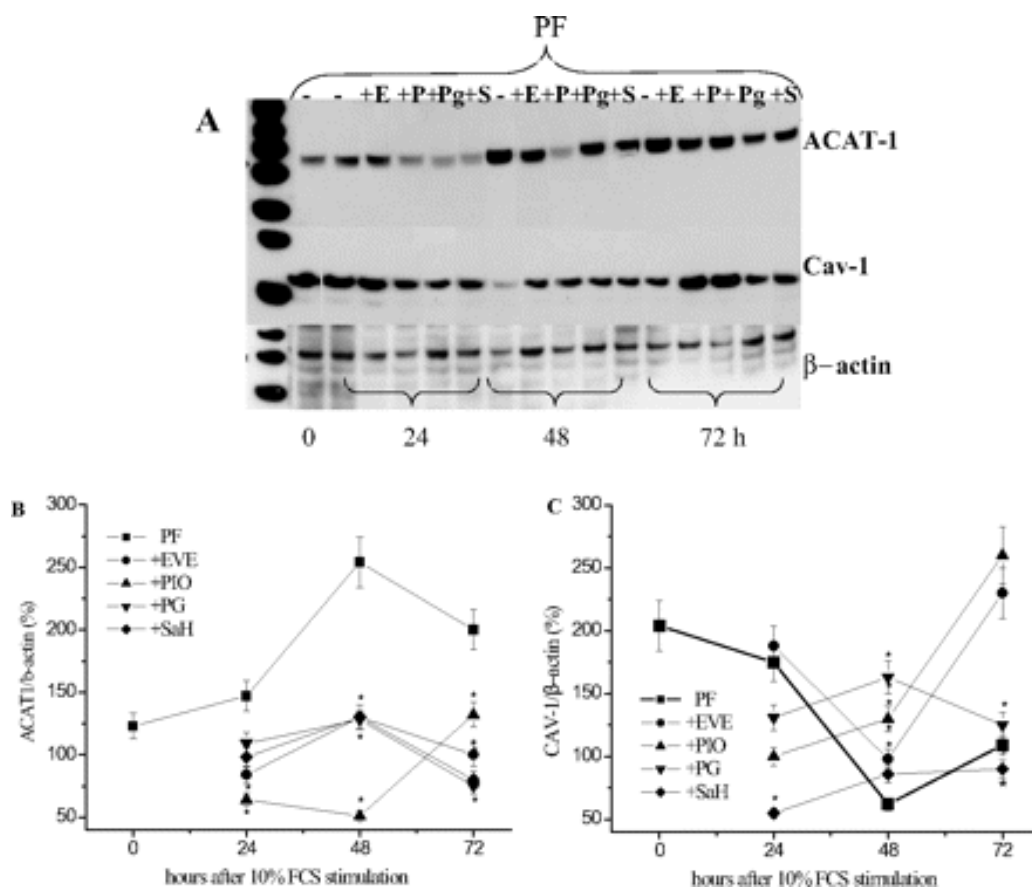


***Effetto dei Farmaci sull'espressione proteica dell'ACAT1 e della caveolina-1 nei PFs stimolati.***

Negli ultimi anni studi sempre più numerosi hanno confermato che alcune proteine coinvolte nella trasduzione del segnale sono localizzate nelle rafts lipidiche/caveole (Roy et al 1999; Okamoto ,Schlegel 1998). Il mantenimento di adeguati livelli di colesterolo nelle membrane cellulari è dunque essenziale per la funzionalità delle rafts e delle caveole e dipende, almeno in parte, dall'interazione del colesterolo con la proteina caveolina-1, una delle componenti principali delle caveole.

Dato che la trasduzione del segnale svolge importanti funzioni sia nella proliferazione cellulare che nella mitogenesi, abbiamo studiato gli effetti del trattamento delle cellule PFs con PIO, EVE, PG e SaH sull'espressione proteica della caveolina-1 per poi confrontare i livelli di espressione con un'altra fondamentale proteina del metabolismo del colesterolo, l'ACAT1.

I risultati osservati hanno dimostrato un aumento dell'espressione della proteina ACAT1 nelle cellule PFs poste in coltura con terreno addizionato con il 10% di FCS, mentre la caveolina-1 risultava fortemente diminuita.



**Fig.15:** Grafici relativi all'espressione delle proteine ACAT-1 (A) e caveolina-1 (B) in cellule PFs trattate con i farmaci PIO, EVE, PG e SaH. Come si può vedere, vi è un aumento dell'espressione della proteina ACAT1 ed una diminuzione della caveolina-1. I PFs sono stati stimolati a proliferare con FCS al 10%. I dati mostrati rappresentano i risultati ottenuti mediante western blot nei tempi 0, 24, 48, 72h dall'inizio del trattamento con i farmaci. Un pattern simile è stato ottenuto su altri cinque campioni di cellule provenienti da altrettanti pazienti con pterigio. I valori mostrati rappresentano le medie  $\pm$  ES degli esperimenti condotti in triplicato.

\*  $P < 0.05$ , PFs : Pterygium fibroblasts.

Per quanto riguarda l'espressione proteica, i risultati ottenuti hanno confermato in modo evidente quelli relativi ai livelli dell'espressione genica, supportando l'ipotesi che la fase proliferativa delle cellule PFs sia strettamente legata ad eventuali alterazioni nell'omeostasi del colesterolo. I pazienti affetti da pterigio potrebbero pertanto beneficiare dei trattamenti sia con inibitori della proliferazione cellulare che di inibitori dell'esterificazione del colesterolo.

## ***Discussione***

Come abbiamo già visto le alterazioni della sintesi del colesterolo sono frequentemente associate con la proliferazione cellulare; infatti, cellule e tessuti ad elevata attività proliferante si caratterizzano per un'augmentata attività dell'HMGC<sub>o</sub>A riduttasi, per un incremento dell'espressione dei recettori LDL e per un'augmentata esterificazione del colesterolo. Questi dati suggeriscono un ruolo chiave del metabolismo lipidico nei processi di proliferazione cellulare. Un lavoro condotto precedentemente nei nostri laboratori ha evidenziato che i tessuti di pterigio iperesprimono i geni dei recettori LDL e dell'enzima HMGC<sub>o</sub>A-R, dimostrando che lo pterigio presenta delle alterazioni nel metabolismo del colesterolo (Petruzzo et al 2001; Batetta et al 2003).

Per indagare ulteriormente su questi aspetti, nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati i fibroblasti di pterigio primario come modello sperimentale per lo studio delle alterazioni del metabolismo del colesterolo (Peiretti, Dessi 2004). I dati ottenuti hanno evidenziato che i fibroblasti di pterigio rispetto a quelli sani (ottenuti da congiuntiva normale) presentano le seguenti caratteristiche: maggior accumulo di lipidi citoplasmatici, maggiore esterificazione del colesterolo seguita da una diminuzione del suo efflusso.

Questi aspetti sono stati attenuati utilizzando dei farmaci antiproliferativi, Pioglitazone (PIO) Everolimus (EVE), ma gli effetti sul metabolismo del colesterolo comparivano prima dell'attività antiproliferativa, ad indicare il ruolo cruciale di questa via metabolica.

Infatti, abbiamo osservato che questi farmaci inibiscono la sintesi del DNA nei PFs, ma il dato interessante è che l'inibizione della proliferazione cellulare è stata preceduta da una forte diminuzione dell'esterificazione del colesterolo associata con una riduzione dell'accumulo di lipidi e un aumento dell'efflusso del colesterolo.

Questi risultati, confermano che le modificazioni nell'omeostasi del colesterolo sono correlate con dei cambiamenti nella proliferazione cellulare dei PFs e possono suggerire che (A) le cellule di pterigio presentano aspetti fenotipici riconducibili a quelli che si osservano in cellule ad elevata proliferazione, e (B) che le alterazioni del metabolismo del colesterolo e della sua omeostasi potrebbero rappresentare fattori predisponenti al danno corneale.

I fibroblasti isolati da pazienti affetti da pterigio mostrano livelli più elevati di esteri del colesterolo rispetto ai fibroblasti derivati dalla congiuntiva sana e rispondono allo stimolo proliferativo aumentando significativamente il proprio contenuto lipidico cellulare al di sopra dei livelli costitutivi (Peiretti et al 2006).

Un'elevata concentrazione di esteri del colesterolo intracellulare potrebbe dunque rappresentare un fenotipo cellulare predisponente all'insorgenza delle lesioni correlate con lo sviluppo dello pterigio.

Inoltre, sia il PIO sia l'EVE sono stati in grado di trasformare il fenotipo proliferativo dei PFs in un fenotipo più simile a quello dei NCFs, mediante l'inibizione del metabolismo del colesterolo, dimostrando indirettamente il ruolo centrale dell'omeostasi del colesterolo nella patogenesi dello pterigio.

Inoltre, da studi precedenti eseguiti su numerosi tipi di linee cellulari umane, sappiamo che il tasso di proliferazione cellulare è correlato positivamente con l'esterificazione del colesterolo e con i livelli di espressione dell'mRNA dei geni ACAT1 ed MDR1 (Batetta et al 2003; 1999).

I risultati di questo lavoro supportano l'ipotesi che l'esterificazione del colesterolo potrebbe svolgere un ruolo importante nel regolare il tasso di crescita e di divisione cellulare; in questo contesto, l'MDR1 prenderebbe parte a questo meccanismo modulando la quantità di substrato di colesterolo disponibile a livello dell'ER, il quale a sua volta è uno dei principali responsabili dell'attività della proteina ACAT (Batetta et al 2003; 1999).

In questo studio, pertanto, abbiamo utilizzato un modello in vitro per valutare se farmaci antiproliferativi capaci di modulare l'esterificazione del colesterolo fossero eventualmente anche in grado di interferire con la crescita dei PFs.

Quello che abbiamo osservato è che l'inibizione della proliferazione dei PFs, ottenuta mediante somministrazione dei farmaci PIO e EVE, si accompagnava sempre con una diminuzione dell'incremento degli esteri del colesterolo e dell'espressione genica dell'ACAT e dell'MDR1, solitamente, sovraespressi nelle cellule che proliferano in modo anomalo (Batetta et al 1999; Dessi et al 1997). Entrambi gli inibitori, inoltre, aumentavano l'espressione dell'mRNA dei geni nCEH e caveolina -1, in modo simile agli inibitori specifici dell'esterificazione del colesterolo come il PG ed il SaH.

Inoltre, recentemente, sia il PIO che un analogo dell'EVE si sono dimostrati capaci di inibire la neovascolarizzazione a livello della cornea e della coroide in modelli animali (Sarayba et al 2005; Dejneka et al 2004).

Si è ipotizzato che questo effetto fosse correlato con le loro ormai riconosciute proprietà antiinfiammatorie e anti-proliferative osservate su un vasto range di linee cellulari umane (Sarayba et al 2005; Dejneka et al 2004).

Tutti questi risultati finora esposti, fanno ritenere che questi farmaci inibiscano la crescita cellulare mediante un meccanismo di modulazione del metabolismo del colesterolo.

Come ulteriore riprova che l'esterificazione del colesterolo svolge un ruolo importante nello sviluppo dello pterigio, abbiamo infatti dimostrato che, inibendo l'esterificazione del colesterolo mediante farmaci come il SaH ed il PG, si otteneva una forte riduzione del tasso di crescita dei PFs, in concomitanza con la riduzione della concentrazione dei lipidi citoplasmatici, così come osservato dopo il trattamento con PIO ed EVE.

Questi effetti non erano dovuti a tossicità cellulare poiché, alle concentrazioni dei farmaci usate, sia la morfologia sia la vitalità delle cellule risultavano preservate.

Un'altra importante scoperta di questo studio è che le cellule PFs esprimono livelli di mRNA dei geni ACAT ed MDR1 più elevati rispetto ai PFs trattati con inibitori dell'esterificazione del colesterolo. Tuttavia, ancora non sappiamo come gli esteri del colesterolo e le proteine coinvolte nel ciclo degli esteri del colesterolo agiscano in concerto per modulare la proliferazione cellulare.

Il ruolo svolto dal metabolismo del colesterolo durante la fase proliferativa delle cellule è ben conosciuto e documentato e, in questo contesto, potrebbe essere molto importante (Batetta et al 1999; Dessi et al 1997; Pani et al 2000). Inoltre, è stato descritto estesamente il ruolo svolto dalla Pglicoproteina MDR1 (Pgp) nel trasporto di numerosi lipidi di membrana, incluso il trasporto del colesterolo dalla membrana citoplasmatica al ER, dove avviene l'esterificazione da parte dell'ACAT (Batetta et al 1998; Metherall, Li 1996; Debry, Nash 1997).

Già in precedenza è stato dimostrato che l'esterificazione del colesterolo dipende dalla sua disponibilità a livello della membrana plasmatica del ER dove viene trasportato, e che la proteina Pgp codificata del gene MDR1 è necessaria perché possa avvenire questo trasporto (Batetta et al 1998; Metherall, Li 1996; Debry, Nash 1997).

Le rafts, come abbiamo visto, possono essere considerate come delle piattaforme specializzate per la trasduzione, in cui l'affinità delle proteine residenti è modificata dalla componente lipidica, in particolare dal colesterolo libero, in modo sito specifico in risposta a degli stimoli fisiologici.

Gli studi condotti su cellule depletate dal colesterolo a livello delle rafts hanno dimostrato che un livello ridotto di colesterolo rappresenta già di per sé un segnale di attivazione delle vie che innescano la divisione cellulare (Pralle, Keller 2000; Kurzchalia, Parton 1999; Okamoto, Schelegel 1998; Fielding & Fielding 2000; Furuchi & Anderson 1998).



Considerando globalmente tutte queste informazioni e scoperte, possiamo ipotizzare che l'MDR1 sarebbe in grado di influenzare in modo specifico il signaling dipendente dalle rafts/caveole mediante la regolazione, almeno parziale, del colesterolo disponibile per la formazione delle rafts/caveole stesse e che quindi la proteina MDR1, il colesterolo e la proliferazione delle cellule siano strettamente correlati.

## Generalità sulle Leucemie

Sono un gruppo di malattie maligne eterogeneo del sistema emopoietico caratterizzate dalla proliferazione clonale di cellule staminali totipotenti o già orientate in senso mieloide (linea granu e monocitopoietica) o linfoide (cioè linfocitarie nulle, di tipo B, pre-B e T).

Vengono classificate in acute e croniche. Le acute si caratterizzano per infiltrazione dei tessuti emopoietici ed extraemopoietici da parte di linee cellulari monomorfe senza chiaro orientamento maturativo (blasti), ad esordio improvviso e con decorso aggressivo, invasione del midollo osseo (dolori ossei, s.anemica, infettiva, emorragica). Le forme croniche hanno un decorso lento e si caratterizzano per la proliferazione di cellule più differenziate, molto simili ai normali costituenti.

Le forme acute sono:

- a) leucemie linfoide (LAL), a forme "comuni", "nulle", di tipo B, pre B e T cellulari;
- b) leucemie mieloidi (LAM) o non linfoide (LANL), caratterizzate dalla proliferazione di blasti originati dalla linea granulo-emonocito-poietica, con decorso grave (per es. leucemia acuta mieloblastica, promielocitica, mielocitica, monocitica, eritroleucemica)

Le forme croniche sono:

- a) leucemia mieloide cronica, che nell'85% ha un marker cromosomico, il cromosoma Philadelphia;
- b) leucemia linfatica cronica, ad andamento lento, dell'anziano con sopravvivenza di 4-6 anni;
- c) leucemia a cellule capellute o "hairy";

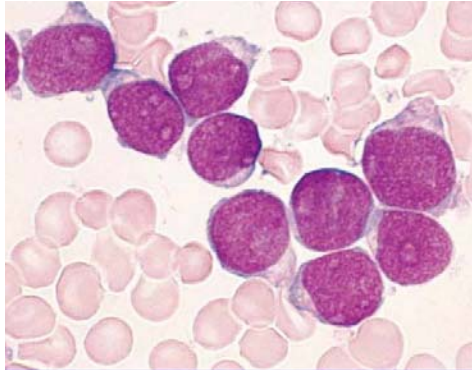
d) leucemia prolinfocitica.

**Incidenza.** La leucemia incide in USA ed Europa per 3,5-6,7 nuovi casi ogni 100.000 abitanti e rappresenta il 30% delle forme neoplastiche. Le due forme principali sono la LAL e la LAM; le LAL hanno una distribuzione bimodale: incidenza maggiore nei bimbi fino a 5 anni, poi declino fino a 40 anni e quindi successivo incremento. Lo stesso dicasi per le LAM, con picco al di sotto dei 5 anni ed incremento al di sopra dei 50 a.

**Eziologia.** Numerosi sono i fattori genetici o ambientali che causano o si associano all'insorgenza di leucemia. Tra i primi, abbiamo 1) le condizioni ereditarie e congenite (anomalie dei cromosomi 8, 15 e 17 in traslocazione, 8-21), per es. Sindrome (s.) di Down, s. di Patau, s. di Klinefelter (XXY), s. di Fanconi, s. di Wiskott-Aldrich; 2) condizioni ematologiche, per es. anemie aplastiche, emoglobinuria parossistica notturna, mieloma multiplo, policitemia vera, linfomi di Hodgkin e linfomi non -Hodgkin ; 3) esposizioni ambientali a virus leucemogeni (virus RNA-virus, HTVL II), radiazioni (vedi Hiroshima e Nagasaki), benzolo, arsenicali, cloramfenicolo, antiblastici (agenti alchilanti).

## LEUCEMIE ACUTE.

### *Le leucemie acute linfoblastiche (LAL)*



I linfoblasti sono le cellule che le caratterizzano: sono poco differenziate, dotate di citoplasma basofilo, privo di corpi di Auer e di granulazioni azzurrofile, con nucleo e due nucleoli e cromatina a struttura

fine, ammassata. I linfoblasti sono negativi alla colorazione con Sudan nero, mentre alcune cellule si colorano anche col PAS o acido periodico di Schiff, ed hanno attività perossidasi. La classificazione morfologica distingue la LAL in L1 (cellule piccole, cromatina omogenea, contorno regolare, basofilia modesta) , L2 (cellule medio-grandi, con cromatina dispersa o addensata, nucleoli ben visibili, contorno irregolare, netta basofilia) e L3 (cellule grandi, cromatina addensata, nucleoli ben visibili, vacuolizzazione del citoplasma). Inoltre con le nuove tecniche è possibile definire le popolazioni di cellule tumorali in linfoidi B, T e "null" ; i linfociti B esprimono le immunoglobuline citoplasmatiche o cIg), di superficie (Sig), i recettori per la frazione Fc delle immunoglobuline e per la terza componente del complemento C3, ed antigeni correlati al locus HLA-D (DR o Ia-like). Questi antigeni di membrana HLA- DR o Ia-like sono specifici delle linee cellulari B linfoidi, ma attualmente sono state riscontrate anche nelle cellule mieloidi, nei linfoblasti non-T ed in cellule attivate;

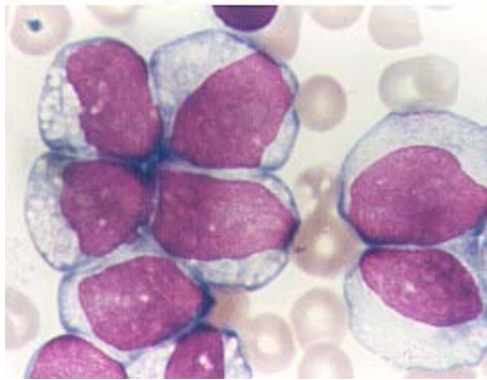
***Leucemie linfoblastiche a cellule B.*** E' una varietà rara (0,5-2% delle LAL); sintetizzano una immunoglobulina di membrana per lo più una IgM esprimono antigeni Ia like, CD 19 e CD20;

***Leucemie linfoblastiche common.*** Costituiscono il 75% dei casi di LAL dell'infanzia ed il 50% di LAL dell'adulto ed esprimono l'antigene comune, si dividono in pre-B e pre B precoce; Le pre-B precoce non presentano immunoglobuline di membrana, né citoplasmatica, mentre le pre-B hanno nel citoplasma la catena alfa pesante delle immunoglobuline. Esprimono HLA-DR ed elevati livelli di TdT, CD19 e CD 20.

***Leucemie acute linfoblastiche a fenotipo null.*** E' un sottogruppo che comprende il 5-15% delle LAL dell'infanzia ed il 35% circa delle LAL dell'adulto. Esprimono antigeni HLA-DR e CD19, CD 10, CD 20 ma non altri marker B-linfoidi. Alcune linee cellulari esprimono le catene delle immunoglobuline e vengono ritenute una sorta di preB- CALLA Negative.

***Leucemie acute linfoblastiche a cellule T.*** A fenotipo immunologico T rappresentano il 10-20% delle LAL; a seconda del grado di differenziazione intratimica dei T-linfociti, avremo lo stadio I del timocita precoce; stadio II del timocita comune; stadio III del timocita maturo. Con maggiore frequenza si riscontrano le forme a protimocita o stadio I; le cellule sono HLADR negative, TdT positive, antigene di CALL positivi.

### *Le leucemie acute mieloidi (LAM)*



Il termine è comprensivo di varie forme leucemiche che, pur essendo caratterizzate da aspetti clinici e prognostici in parte simili, mostrano una spiccata eterogenità citomorfologica; vengono classificate in forme ad orientamento granulocitico, M1, M2, M3.

M1 o leucemia mieloblastica senza maturazione. Le cellule sono blasti indifferenziati con nucleo prevalentemente rotondeggiante, cromatina fine, nucleoli evidenti; essenziale per la diagnosi sono le reazioni citochimiche (perossidasi, naftol AS-D cloroacetato esterasi, naftol AS-D acetato esterasi, alfa-naftil acetato esterasi).

M2 o leucemie mieloblastica con maturazione. Sono cellule più differenziate, con granulazioni azzurrofile, corpi di Auer, reazione alla perossidasi e al Sudan nero ed alle altre reazioni (naftol AS-D cloroacetato esterasi, naftol AS-D acetato esterasi, alfa-naftil acetato esterasi).

M3 o leucemia promielocita. La maggior parte delle cellule leucemiche è costituita da promielociti abnormi con voluminose granulazioni.

Nell'ambito delle forme orientate in senso monocitico, avremo:

M4 o leucemia mielomonocitica. Sono cellule che ricordano i monociti (promonociti e monociti). Per la distinzione si ricorre a prove citochimiche; per es. positiva è la reazione alla naftil-acetato-esterasi.

M5 o leucemia monocitica pura. Si caratterizzano per linee cellulari del tipo dei monociti in vario stadio evolutivo: monoblasti, promonociti, monociti. Si dividono in forme differenziate e forme non differenziate

M6 omielosi eritremica acuta. Cellule del tipo eritroblastico.

M7 LANL. A cellule del tipo megacarioblastico.

**Sintomatologia.** Dopo questa classificazione che interessa l'ematologo, diremo che i sintomi si caratterizzano per una triade data da *anemia, complicanze infettive da neutropenia, emorragia da piastrinopenia*. La sindrome anemica si caratterizza per astenia, esauribilità fisica, ingravescente, cardiopalmo e dispnea da sforzo. La febbre è talora elevata ma può essere intermittente o remittente o capricciosa con puntate serotine; essa dipende da infezioni che si manifestano non appena il tasso dei granulociti si abbassa sotto 1.000/mm<sup>3</sup>, così come la mortalità aumenta con l'abbassarsi del tasso: da batteri (stafilococchi, streptococchi, bacillus subtilis, listeria monocytogenes, pseudomonosa aeruginosa, E.coli, proteus vulgaris, bacillus gragilis; da virus herpetici, citomegalovirus, Ebstein Barr, morbillo, protozoi). L'emorragia compare nel 5-10 % dei pazienti a carico della cute e delle mucose (ecchimosi,

petecchie, epistassi e gengivorragie, nelle donne metrorragie. La sindrome infiltrativa si caratterizza per adenomegalia, splenomegalia, incremento del volume splenico, mentre l'epatomegalia si riscontra prevalentemente nelle LAM; l'infiltrazione della cute e delle gengive da parte dei blasti leucemici è caratteristica delle leucemie mielomonocitica e monocitica. Anche il tenue può essere interessato (enterite necrotizzante), con dolori addominali ed enterorragie. Un interessamento del SNC (meningite leucemica) è responsabile di exitus. Il dolore osseo dipende dal rapido e progressivo aumento di volume del midollo osseo con compressione ed infiltrazione leucemica del periostio, specie per le ossa piatte (coste e sterno). Il quadro ematologico si caratterizza per un'anemia del tipo normocromico-normocitico, raramente compare anisopoichilocitosi, con reticolociti ridotti, a conferma della natura arigenerativa dell'anemia; le piastrine in oltre il 60% dei casi risultano inferiori a  $50 \times 10^3$  / microlitro. Il numero dei leucociti può variare con una conta superiore a  $100 \times 10^3$ , e/o tra  $10 \times 10^3$  e  $100 \times 10^3$  / microlitro. I 2/3 dei pazienti a causa dell'elevato turnover della massa cellulare mostrano rialzo dell'acido urico che precipita a livello renale e si rende responsabile di severe complicanze della funzionalità renale fino al quadro della uropatia ostruttiva; si possono osservare rialzi dei valori delle transaminasi, bilirubina e fosfatasi alcalina. Può essere presente ipercalcemia. Esistono, infine, deficit della coagulazione dei fattori V, X, XII, dovuti a coagulopatia da consumo.



**Terapia.** Il trattamento della LA comporta due aspetti :  
a) la cura sintomatica o di supporto, b) la cura specifica.

La cura specifica si avvale dell'induzione della remissione completa ottenuta con l'impiego di uno o più agenti chemioterapici antiblastici + il cortisone; quindi si intensifica la cura con lo scopo di colpire eventuali linee cellulari che residuano; in ultimo si attua un mantenimento e si associa un trattamento chemioterapico con l'intento di effettuare una profilassi della meningite leucemica.

Gli schemi di induzione della remissione per la LAL comprendono l'associazione di :

Vincristina + Cortisone (successo 50-88% dei casi)

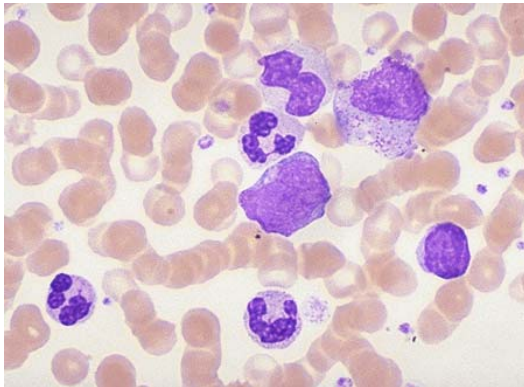
Vincristina+Cortisone+Asparaginasi  
(successo 50-88% dei casi)

Vincristina+Cortisone+Daunomicina  
(successo 50-100% dei casi)

I migliori risultati si hanno nei bambini rispetto agli adulti, che rispondono meno bene alla cura.

Quindi si effettua un mantenimento con metotrexate settimanale e della 6-mercaptipurina giornaliera, per 3 anni. Nella localizzazione leucemica del SNC si impiega la radioterapia sull'encefalo (1800-244 Rds) e l'infusione endorachide di metotrexate (10mg/kg per un totale di 5 somministrazione).

## LEUCEMIE CRONICHE.



*Leucemia mieloide cronica (LMC) o leucemia granulocitica* è considerata come affezione neoplastica caratterizzata dalla proliferazione di precursori mieloidi, specialmente della

linea granulopoietica (Lowenberg B, Downing JR 1999)

**Eziologia.** Sconosciuta ma pare che importanza notevole rivestano le radiazioni ionizzanti: l'altissimo numero di casi di LMC tra i superstiti di Hiroshima e Nagasaki, l'insorgenza della malattia fra gli operai delle centrali nucleari, nonché radiologi e personale medico e paramedico; anche il benzolo, come sostanza chimica, ne è responsabile.

Quanto al ruolo della malattia nelle anomalie cromosomiche, la presenza del cromosoma Philadelphia (Ph1) è associata alla LMC; l'anomalia consiste nella delezione di materiale genetico dal braccio lungo del cromosoma 22 al capo distale del braccio lungo di un cromosoma 9, per cui il cromosoma 22 appare metacentrico. L'aumento della massa granulocitaria che ne deriva è la risultante del concorso di due diverse ma convergenti determinanti: incremento globale della produzione cellulare, vita media delle cellule leucemiche sensibilmente più lunga.

**Incidenza.** La patologia incide per 1 caso su 100.000 persone/anno e risultano colpiti soggetti tra i 20 e i 60 anni. La malattia può avere un periodo di latenza clinica nel corso del quale manca qualsiasi fenomenologia obiettiva, se non turbe

dispeptiche accompagnate da tensione gravativa all'ipocondrio sinistro.

**Quadro clinico.** Il paziente lamenta astenia, malessere generale, facile esauribilità, cardiopalmo e tachicardia, pallore cutaneo, dolori ossei sordi, osteocopi localizzati alle tibie ed allo sterno, dolori all'ipocondrio di sinistra, che si accentuano con gli atti del respiro, movimenti febbricolari serotini; anemia che domina il quadro. Compaiono splenomegalia ed infarti splenici, e la milza diventa enorme tanto da raggiungere il polo inferiore dell'arcata inguinale per un peso di 8-10 Kg ed epatomegalia per aree di infiltrazione leucemica; i linfonodi, sia superficiali che profondi, sono interessati; e le sindromi neurologiche per gli infiltrati leucemici e le lesioni retiniche

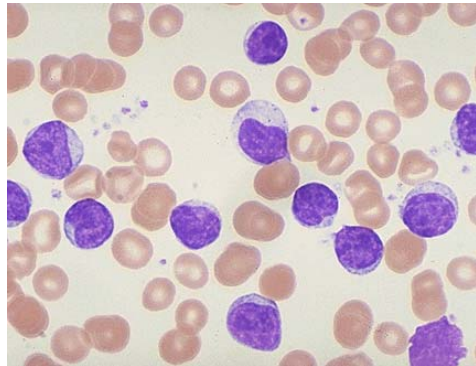
**Laboratorio.** Incremento eccezionale sino ad un milione/mm<sup>3</sup> di cellule reattivamente ai globuli bianchi; di solito di 30-40.000 elementi/mm<sup>3</sup> sino a 300-400.000 ed il quadro leucocitario differenziale evidenzia elementi della linea granuloblastica, in tutte le varie fasi della loro maturazione. Anche gli eosinofili ed i basofili possono presentare un incremento notevole di numero ed avremo talora i quadri di leucemia a cellule eosinofile e leucemia a cellule basofile. Il numero dei globuli rossi può risultare diminuito per restrizione della matrice eritropoietica. I reperti midollari non forniscono nella LMC indicazioni particolarmente significative se si prescinde dalla abnorme ipercellularità dell'aspirato midollare. Da segnalare che la fosfatasi alcalina leucocitaria è notevolmente ridotta nella LMC e che il cromosoma Ph1 dà risultati positivi nel 90%.

**Decorso.** La malattia si caratterizza per infezioni intercorrenti e si conclude per la cosiddetta "crisi blastica" preceduta da un aggravamento del quadro dell'anemia, emorragia, dimagrimento, epato- e splenomegalia.

**Terapia.** Si avvale dell'impiego alternativo di 2 farmaci principali, il busulfano e l'idrossiurea che vengono usati facilmente anche dal medico di base, a patto che monitorizzi la crisi leucocitaria e piastrinica e tenga conto degli effetti collaterali che comprendono fibrosi polmonare, ipogonadismo, ipocorticosurrenalismo, aplasia midollare. Il busulfano che è più maneggevole va somministrato al dosaggio di 4-6 mg/die e la idrossiurea a 500-2000 mg/die. Infine là dove è indicato si farà ricorso alle trasfusioni di sangue intero. In questi ultimi anni si impiega anche l'interferone, che è una proteina naturale ottenuta con tecniche di DNA ricombinante, un procedimento che si avvale dei batteri a cui si "danno le informazioni genetiche" utili per la sintesi delle proteine, così come si fa per la sintesi dell'insulina.

Una speranza è rappresentata, infine, dal trapianto allogenico di midollo che risolve in maniera radicale questa forma di leucemia.

***Leucemia linfatica cronica (LLC).*** E' un'affezione del sistema



linfopoietico, caratterizzata per proliferazione normotopa ed eterotopa, dei tessuti linfocitopoietici, svincolata da qualsiasi controllo omeostatico. La malattia è considerata di natura neoplastica anche se

alcuni parlano di linfociti immunologicamente incompetenti con una durata di vita aumentata. Inizialmente essi si moltiplicano nei linfonodi, nella milza e nel midollo osseo, ma col progredire dell'affezione possono essere coinvolti dal processo morboso altri organi ed apparati come il fegato, la milza, la cute, il tubo gastroenterico, il sistema nervoso centrale. La proliferazione interessa un solo clone cellulare di natura B linfoide, com'è dimostrato dal carattere omogeneo delle immunoglobuline di superficie sintetizzate dai linfociti leucemici; esse sono costituite da catene leggere del tipo k, nel 75% o lambda nel 25%; le più comuni Ig sono le IgM, ma anche le IgG o le IgA. Di rado può essere interessata la linea T (timodipendente) e i linfociti leucemici non presentano immunoglobuline di superficie, formano rosette spontanee con emazie di montone (E rosette) e sono in grado di interagire con eteroantisieri-anti T.

**Incidenza.** La LLC predilige il sesso maschile (2:1), ma si manifesta dopo i 60 anni; le radiazioni ionizzanti non la determinano.

**Quadro clinico.** L'esordio è subdolo e graduale, si accompagna alla tumefazione linfoghiandolare, inizialmente le laterocervicali e le sopraclaveari, poi sottomandibolari,

ascellari, inguinali, lomboaortici, mediastinici che si ingrossano fino a raggiungere dimensioni notevoli (grossa noce, uovo, piccolo mandarino) e causano deformazione delle sedi interessate (collo proconsolare). I linfonodi sono agevolmente spostabili, a superficie liscia, regolare, consistenza parenchimatosa normale. Localizzazioni atipiche della LLC possono aversi alle ghiandole lacrimali, la cui tumefazione associata all'ingrossamento dei linfonodi sottomascolari configura la sindrome di Mikulicz. Quindi compaiono i segni dell'anemia perchè si ha invasione massiva del midollo emopoietico. L'anemia può derivare, inoltre, dalle crisi emolitiche acute che conseguono a movimenti anticorpali contro i globuli rossi. Compaiono anche manifestazioni emorragiche cutanee e/o mucose, quando il livello delle piastrine si riduce. Le lesioni dermatologiche sono caratterizzate da papule, noduli, infiltrati variamente configurati, con intenso prurito ed un herpes zoster ed insorge eritrodermia diffusa. La milza si ingrossa perchè interessata dal processo, lo stesso altri organi possano infiltrarsi (tubo digerente, respiratorio, cardiocircolatorio).

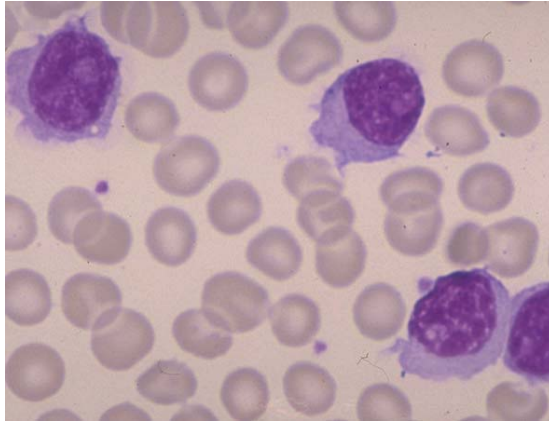
**Laboratorio.** Anemia, con numero dei globuli bianchi incrementato di oltre 150-200 mila unità/mm<sup>3</sup>, chiaramente forme linfocitarie, piccoli linfociti, con scarsissimo citoplasma basofilo, privi in genere di granuli azzurrofilo, con nucleo quasi nudo, sprovvisto di nucleolo, con immunoglobuline di membrana, che denunciano la loro origine B linfoide, mentre la quota T-linfoide è scarsamente rappresentata. Nel midollo il fenomeno più appariscente è l'ipercellularità con aspetto monomorfo dell'aspirato o del prelievo biotico per la massiccia infiltrazione di elementi linfoidi sino al 90% della popolazione.

Inoltre diminuiscono le immunoglobuline, quelle buone, e si ha un incremento delle scorie uratiche

**Terapia.** Il decorso è in genere lentamente progressivo ed alterna periodi di remissione clinica, a periodi di peggioramento. Le complicanze sono di natura infettiva, immuno-emolitiche, con calo delle piastrine.

La cura si avvale del chlorambucil, che si avvale di periodi di controllo della crasi leucocitaria e piastrinica, meglio se associato a prednisone o prednisolone. Lo schema più seguito è la somministrazione orale di 0,1-0,2 mg/Kg/die di chlorambucil associato a 20-40 mg/die di prednisone sino alla caduta dei globuli bianchi sotto 10-50.000/mm<sup>3</sup>. Al posto del chlorambucil però si può impiegare la ciclofosfamida. Se la gravità lo richiede, si può impiegare anche la vincristina e il prednisone. L'interferone è oggi il farmaco di scelta per la leucemia "hairy", ma per la LLC non è indicato.

***Leucemia a cellule filamentose (tricoleucemia o "hairy" o***



***LCF)***. E' una forma che si caratterizza per cellule "hairy", capellule, cioè provviste di villi citoplasmatici che sono probabilmente di natura B-linfoide, mentre altri

sostengono la loro genesi istiocitaria; tuttavia le cellule "hairy" presentano immunoglobuline di superficie e ciò depone per la prima ipotesi. Il quadro clinico di questa forma è sovrapponibile a quello delle altre forme croniche; le cellule hairy raggiungono le 5-10 mila unità/mm<sup>3</sup>, talora però si portano fino a 100.000 unità, con riduzione delle altre linee cellulari, comprese i granulociti neutrofilici. Lo striscio si colora con il May-Grunwald-Giemsa e consente di osservare le cellule filamentose, con citoplasma abbondante, tenuemente basofilo, con caratteristiche estroflessioni filamentose. Il decorso è cronico ed un tempo si effettuava la splenectomia. I farmaci usati sono la vincristina, la ciclofosfamida ed il prednisone, a cui si aggiunge oggi l'interferone.



## ***Mateiali e metodi***

### *Selezione dei pazienti*

In una prima serie di studi abbiamo ottenuto prelievi di sangue venoso periferico da 8 pazienti con leucemia linfocitica cronica (CLL) (di età compresa tra i 45-65 anni) e 12 pazienti con leucemia linfocitica acuta (di età compresa tra 40-60 anni

; tutti i campioni dei pazienti leucemici sono stati reclutati presso l'Ospedale Oncologico "Armando Businco" USL 8, Cagliari). Quindici individui sani della stessa età sono stati invece utilizzati come controlli (reclutati presso il Centro Trasfusionale, USL 7, Iglesias). Lo scopo è stato valutare il contenuto intracellulare dei lipidi e il profilo lipidico del sangue nei pazienti leucemici. In una seconda serie di studi abbiamo selezionato 10 pazienti (7 con CLL a 3 con ALL) per effettuare analisi cinetiche e molecolari. Nei nostri esperimenti sono state utilizzate anche linee cellulari di linfociti T umani leucemici CCRF-CEM e le CCRF-CEM-VCR.

*CCRF-CEM*: linea cellulare a cellule T isolata da pazienti con leucemia acuta : la linea è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).

*CCRF-CEM vcr*: la linea è stata selezionata dalle parentali *CCRF-CEM* utilizzando concentrazioni crescenti di vincristina solfato (Fluka) (Polekova et al., 1992). Le cellule inizialmente sono state tenute in coltura in presenza di una concentrazione sub-inibitoria di farmaco (2nM). Dopo circa 40 passaggi in coltura, in cui la concentrazione di farmaco veniva progressivamente aumentata, sino alla dose massima di 20 nM, si è ottenuto un clone di cellule capaci di crescere sia in assenza che in presenza di 20 nM di vincristina. Tale clone è stato amplificato mantenendolo in coltura in presenza del

farmaco. Sono stati valutati periodicamente il grado di resistenza al farmaco ( $^3\text{H}$ -vinblastina) e i livelli di espressione del gene MDR 1, per verificare la stabilità della resistenza di queste cellule.

La ricerca è stata effettuata in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato scritto è stato ottenuto da tutti i pazienti prima di iniziare gli studi.

#### *Condizioni di coltura*

I linfomonociti (PBMCs) ottenuti dai pazienti leucemici e dai controlli sono stati isolati dopo centrifugazione di sangue venoso periferico su gradiente di Ficoll. Le cellule sono state risospese ( $1 \times 10^6$  cell/ml) in RPMI-1640 con il 10% di FCS e incubate tutta la notte a  $37^\circ\text{C}$ . Per gli esperimenti,  $2 \times 10^5$  cell/ml sono state incubate a  $37^\circ\text{C}$  in RPMI-1640 supplementato con PHA ( $10\mu\text{g/ml}$ ) in presenza e assenza di SaH, Progesterone (PG) ed Everolimus.

Le cellule sono state raccolte a tempi precisi dopo i trattamenti e la loro vitalità è stata valutata attraverso il tripan blu test. Gli esperimenti preliminari sono stati effettuati per valutare gli effetti esercitati dai farmaci sulla vitalità cellulare (Pg  $10\mu\text{M}$ , SaH  $4\mu\text{M}$ , ed Everolimus,  $20\text{nM}$  rispettivamente).

#### *Test dei lipidi*

I campioni di plasma eparinizzato venivano raccolti per il test dei lipidi. Colesterolo totale (TC), Trigliceridi (TG), e fosfolipidi (PL) erano determinati enzimaticamente (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Le lipoproteine ad alta densità (HDL-C) sono state determinate dopo la precipitazione dell' apolipoproteina B (APO-B) con il cloruro di magnesio e il dextran solfato.

### *Contenuto intracellulare dei lipidi*

Dopo l'estrazione dei lipidi con acetone i lipidi neutri sono stati separati su piastre di silice mediante cromatografia su strato sottile (TLC) usando come solventi di eluizione un sistema contenente esano/etere etilico/acido acetico (70:30:1). La quantità di colesterolo libero (FC), esteri del colesterolo (CE), trigliceridi (TG) e fosfolipidi (PH) è stata determinata attraverso saggi enzimatici.

### *Colorazione dei lipidi*

I linfomonociti (PBMCs) ottenuti dai pazienti leucemici e dai controlli sono stati messi in coltura come descritto sopra. Dopo i tempi di incubazione indicati, le cellule venivano lavate per tre volte con PBS e fissate con la formalina calcica al 10%. Una volta avvenuta la fissazione, è stata rimossa la formalina e le cellule sono state colorate per 10 minuti con "Oil Red O". I passaggi successivi prevedono una rapida differenziazione in Alcool Isopropilico al 60% per 3-5 secondi, lavaggio in acqua distillata e per finire le cellule vengono contrastate con ematossilina di Mayer (Sigma Aldrich, Germany). Le cellule colorate sono state esaminate al microscopio ottico.

### *Incorporazione di [<sup>3</sup>H] timidina nel DNA*

La sintesi del DNA è stata valutata studiando l'incorporazione di [<sup>3</sup>H]timidina nell'acido nucleico. Le cellule sono state incubate per tre ore con 185 KBq/ml di [<sup>3</sup>H]timidina (DuPont NEN spec. Act. 248 GBq/mmol); dopo l'incubazione sono state lavate 2 volte con PBS freddo e 2 volte con una soluzione al 5% di acido tricloroacetico (TCA). Il pellet idrolizzato con una soluzione di NaOH 1M. La radioattività è stata misurata con 'β counter' usando Ecoscint H (Polymed) come liquido di

scintillazione. Un aliquota di idrolizzato è stata utilizzata per valutare il contenuto proteico del campione.

#### *Saggio per l'accumulo di Vinblastina*

L'accumulo cellulare di Vinblastina è stato valutato in base al metodo descritto da Metherall et al (Metherall et al 1996)

A un tempo stabilito  $2 \times 10^5$  cells/ml sono state incubate per 2 ore con [ $^3\text{H}$ ]vinblastine sulphate, poi lavate per tre volte in PBS ghiacciato e infine lisate in 0.1M di NaOH. Il lisato è stato utilizzato per le proteine e per testare il contenuto di [ $^3\text{H}$ ]vinblastine.

#### *Esterificazione del colesterolo*

L'esterificazione del colesterolo è stata valutata mediante incorporazione di [ $^{14}\text{C}$ ]oleato contenente [ $^{14}\text{C}$ ]oleato legato ad albumina di siero bovino (BSA, Sigma). Per preparare il complesso [ $^{14}\text{C}$ ]oleato-BSA ai 3,7 MBq di [ $^{14}\text{C}$ ]oleato in etanolo (Amersham, sp. act 2,22 GBq/mmol) sono stati aggiunti 1,4 mg di KOH. Dopo evaporazione dell'etanolo è stato aggiunto un buffer potassio fosfato (PBS) senza  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , contenente 4,24 mg di BSA (acidi grassi essenziali liberi, Sigma) e la miscela così ottenuta è stata usata ad una concentrazione finale di 74 KBq/ml.

Dopo incubazione le cellule sono state lavate con PBS e i lipidi estratti con acetone. Dopo aver evaporato l'acetone il pellet con i lipidi neutri è stato risospeso in piccole aliquote di cloroformio e stratificato su piastre di silice (DC-Alufolien Kieselgel 60; Merk, Darmstadt, Germania). Per la separazione mediante cromatografia su strato sottile (TLC) abbiamo utilizzato come solvente di eluizione un sistema contenente n-eptano/etere isopropilico/acido formico (60:40:2). Alla fine della corsa cromatografica dopo aver fatto asciugare le piastre i lipidi neutri sono stati identificati mediante

esposizione ai vapori di iodio. La banda corrispondente agli esteri del colesterolo è stata tagliata e la sua radioattività misurata al “ $\beta$ -counter”.

*Analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR.*

I livelli di espressione dell'mRNA della cyclin D1, dell'LDL-R, dell'HMGCoA-R e dell'MDR1 sono stati studiati sia nelle cellule leucemiche mediante RT-PCR semiquantitativa utilizzando l'mRNA dell'actina come controllo. L'RNA totale è stato estratto da una quantità totale di circa  $10^6$  cellule prelevate dai campioni trattati con i farmaci e da quelli non trattati. L'estrazione è stata effettuata utilizzando il reagente TRIZOL (TRIZOL Reagent, Invitrogen) una miscela di fenolo e guanidina isotiocianato, il quale mantiene integro l'RNA mentre lisa le cellule e dissolve i componenti cellulari.

Successivamente le stesse concentrazioni di RNA (1 $\mu$ g) per ciascun campione, sono state retroscritte in cDNA utilizzando il metodo random examer.

I cDNA così ottenuto è stato successivamente amplificato mediante PCR con primers specifici secondo i protocolli forniti dalla casa produttrice (GeneAmp RNA PCR Kit, Perkin-Elmer Cetus)

La PCR è stata messa a punto utilizzando i seguenti primers e le relative condizioni di reazione:

Gene target	Primer PCR	Protocollo PCR	Dimensione del prodotto PCR (pb)
<b>Cyclin D1</b>	5'CTGGAGCCCGTCAAAAAGAGC3' 5'CTGGAGAGGAAGCGTGTGAGG3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-45s (30 cicli)	415
<b>HMGC<sub>o</sub>A-R</b>	5' TACCATGTCAGGGGTACGTC 3' 5'CAAGCCTAGAGACATAATCAT 3'	95°C-60s 60°C-45s 72°C-45s (35 cicli)	246
<b>MDR 1</b>	5' CCCATCATTGCAATAGCAGG 3' 5' GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA 3'	94°C-30s 55°C-60s 72°C-60s (30 cicli)	167
<b>β-ACTINA</b>	5' AGGGGCCGGACTCGTCATACT3' 5' GGCGGCACCACCATGTACCCT 3'	96°C-30s 60°C-59s 72°C-45s (30 cicli)	202
<b>LDL-R</b>	5' CAATGTCTCAACCAAGCTCTG' 5' TCTGTCTCGAGGGGTACCTG 3'	96°C-60s 60°C-45s 72°C-45s (35 cicli)	258

Le concentrazioni di cDNA che erano al di sotto del livello di saturazione, necessarie per ottenere delle quantità dei prodotti di PCR proporzionali a quelle iniziali del campione, sono state individuate in esperimenti preliminari condotti per testare un dato intervallo di concentrazioni note del template iniziale. Le successive reazioni di PCR sono state eseguite con le concentrazioni di template al di sotto di quella di saturazione con le stesse condizioni di reazione.

### *Blotting dei prodotti di PCR*

Durante la reazione di PCR è stato introdotto un desossinucleotide marcato, l'<sup>11</sup>-dUTP coniugato con la Digossigenina, una molecola non radioattiva (DIG; Boheringer Mannheim) che, una volta incorporata nel prodotto di PCR, è stata evidenziata mediante reazione con frammenti Fab di anticorpi anti-digossigenina coniugati con una fosfatasi alcalina e visualizzati con il substrato chemiluminescente CSPD.

La defosforilazione enzimatica del CSPD mediante la fosfatasi alcalina produce un'emissione di luce ad una lunghezza d'onda di 477nm che impressiona le lastre radiografiche.

I frammenti di DNA sono stati separati mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio e successivamente trasferiti su una membrana di nylon tramite incubazione per 16 ore in una soluzione di ibridazione 10X SSC. La membrana sulla quale sono stati trasferiti i frammenti ottenuti mediante la PCR è stata esposta su una lastra per autoradiografia per un intervallo tra i 2-10 minuti.

L'intensità delle bande degli autoradiogrammi è stata misurata mediante il software Kodak Digital Science Band Scanner Image Analysis System comprendente l'HP Scanjet, ID Image Analysis.

L'intera procedura è stata standardizzata esprimendo la concentrazione del prodotto di PCR per ognuno degli mRNA bersaglio confrontato con la concentrazione del prodotto ottenuto per la  $\beta$ -Actina. Poiché spesso si ottengono dei prodotti di PCR a bassa concentrazione quando i segmenti di cDNA sono coamplificati nello stesso tubo di reazione con un gene standard di controllo interno, i livelli relativi dell'espressione genica sono stati determinati

confrontando i prodotti di PCR del cDna bersaglio e quelli del gene per la  $\beta$ -Actina processati in tubi di reazione diversi.

*Analisi dell'espressione della p170 glycoprotein (P-gp) mediante Western blotting.*

Le cellule risospese in Ripa Buffer (10% SDS in 50 $\mu$ M tris, 1M EDTA, pH 7.5, 50 $\mu$ M DTT, addizionato con un inibitore delle proteasi) sono state lisate mediante incubazione a 37° e ripetuti passaggi attraverso un ago 22-gauge. La concentrazione proteica del lisato ottenuto è stata determinata mediante il kit BCA (Sigma Bicinchoninic Acid). Successivamente i campioni di proteine (50 $\mu$ g) sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilamide al 12% in SDS (sodium dodecyl sulfate, SDS-PAGE). Le proteine così separate sono state successivamente trasferite su una membrana in PVDF (polyvinylidene Fluoride, invitrogen).

La membrana è stata saturata (blocking) con una soluzione di TBST (tris-Buffered Saline Tween-20) con il 5% di latte a temperatura ambiente per 1.5 h (50 $\mu$ M Tris-HCL pH 7.6, 0.15M NaCl e Tween-20 allo 0.05%) e quindi incubata per 1.5 h con l'anticorpo primario anti-MDR1 H-241 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) risospesi nella stessa soluzione di TBST usata per il blocking.

La fase successiva consisteva nell'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi (horseradish peroxidase, HRP, Santa Cruz Biotechnology, CA) per un'altra ora e mezza.

La membrana è stata poi lavata accuratamente con TBST 1x (50 $\mu$ M tris-HCL, ph 7.6 e 0.15 M NaCl) Le bande immunoreattive sono state poi visualizzate mediante il reagente di rivelazione ECL (Enhanced Chemiluminescence Reaction, Amersham).



Proteina target	% gel	Anticorpo 1°	Diluizione Anticorpo 1°	Anticorpo 1°	Diluizione Anticorpo 2°	Anticorpo 2°
P-gp	12	Rabbit Polyclonal	1:1000	1.5 ore /4°C	1:1000	1.5 ore/T.A

### *Analisi Statistica*

I dati analizzati rappresentano la media  $\pm$  SE per esperimenti condotti in triplicato. La rilevanza statistica delle differenze osservate è stata verificata utilizzando il test t di Student.

Il livello di significatività per tutte le analisi statistiche è stato fissato per un  $P < 0.05$ .

## *Risultati*

### Lipid status di pazienti con CLL e ALL

In questo esperimento abbiamo valutato il profilo lipidico nei linfomonociti e nel plasma di pazienti leucemici.

Abbiamo riscontrato un aumento dei livelli di esteri del colesterolo nei pazienti leucemici rispetto ai controlli (Fig 1,A) e una forte diminuzione del rapporto molare FC:CE (Fig.1,B).

La concentrazione delle HDL-C del plasma erano significativamente ridotte ( $P < 0.05$ ) nei pazienti leucemici comparati con i controlli di pari età. Contrariamente non c'erano differenze significative per quanto riguarda i livelli di TC, TG e PL anche se nei pazienti leucemici è riscontrata una tendenza all'ipocolesterolemia e all'ipertrigliceridemia.

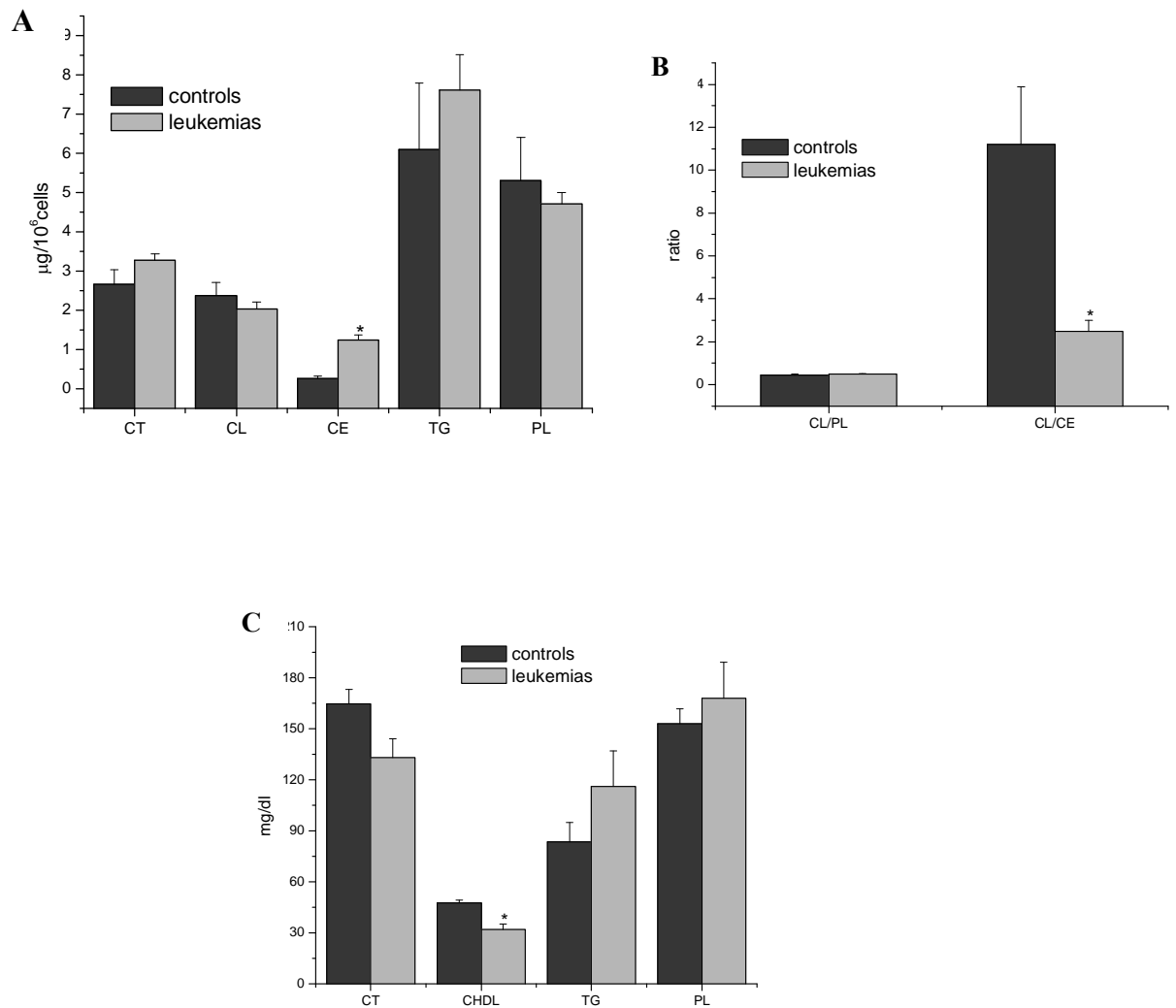
Questi risultati supportano l'ipotesi che le alterazioni del metabolismo lipidico, e soprattutto un aumento degli esteri del colesterolo nelle cellule e una diminuzione del contenuto di HDL-C nel plasma, può rappresentare un ipotetico profilo per questo tipo di malattia.

Per confermare ancor di più questa ipotesi abbiamo studiato l'accumulo di lipidi neutri con la colorazione "Oil red O" nei linfomonociti di pazienti sani e di pazienti con CLL.

Come si può notare (Fig 2) al tempo zero solo le cellule leucemiche hanno un accumulo di lipidi neutri nel citoplasma mentre dopo 24h e 48h di stimolazione con PHA anche le altre cellule diventano positive.

Questi risultati confermano l'associazione tra la crescita cellulare e l'accumulo di esteri del colesterolo, e suggeriscono che le

cellule leucemiche tendono ad accumulare i lipidi neutri più delle cellule normali.



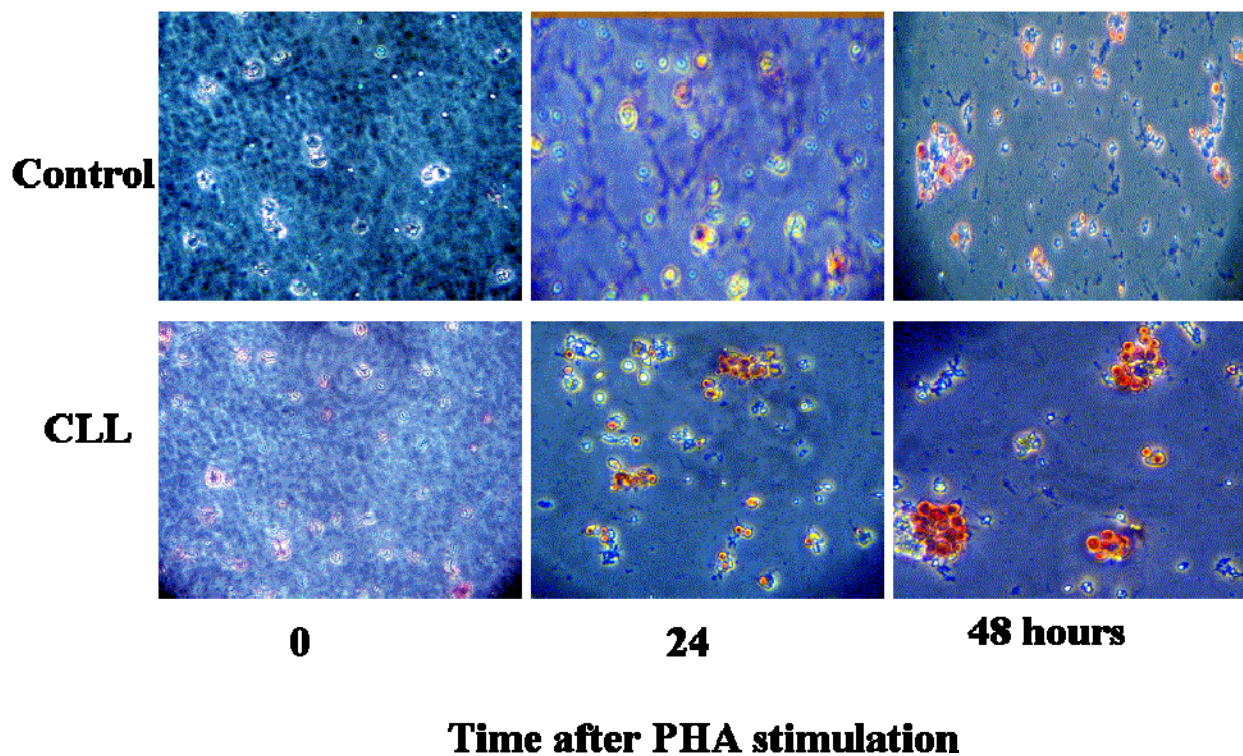
**Fig.1 Lipid status di pazienti leucemici**

A) Contenuto di CT,CL,CE,TG e PL in linfomonociti normali e leucemici. B)

Rapporto molare CL:PL e CL:CE in cellule normali e leucemiche. C) Profilo dei lipidi

nel plasma in pazienti normali e leucemici. I valori rappresentano la media  $\pm$  SE

\* P<0.05



**Fig. 2 Accumulo di lipid droplets in cellule stimulate con PHA.**

I controlli e le cellule leucemiche sono state incubate con PHA ai tempi indicati. Dopo questi tempi le cellule venivano colorate con "Oil Red O". Un aumento nell'intensità di colore si osserva soprattutto alle 48h nelle cellule leucemiche.

## **Effetti dell'inibizione dell'esterificazione nella crescita di cellule ALL e CLL.**

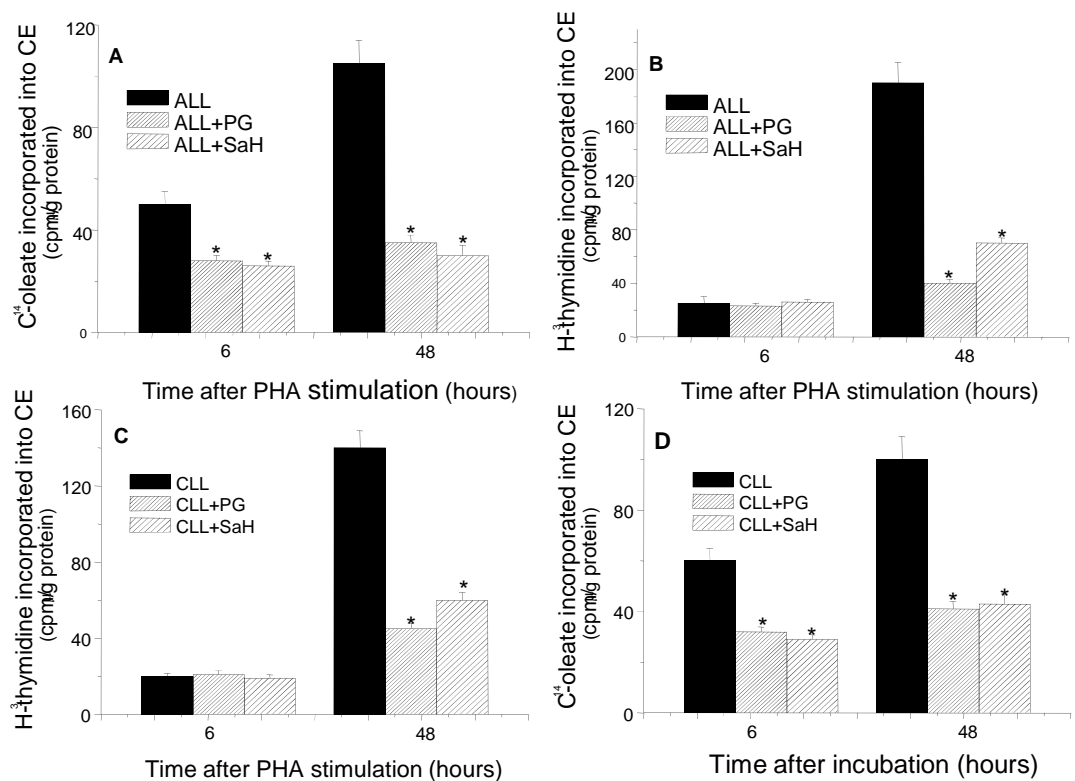
Per capire se l'accumulo di esteri del colesterolo può direttamente influenzare la crescita di cellule leucemiche, abbiamo studiato gli effetti di due differenti inibitori dell'esterificazione del colesterolo: SaH 58-035 Sandoz (SaH) e progesterone (Pg).

Questo studio è stato fatto in cellule ALL e CLL stimulate con PHA nelle quali sono stati valutati l'incorporazione di  $^{14}\text{C}$ -oleato in esteri del colesterolo e l'incorporazione di  $^3\text{H}$  Timidina nel DNA.

Le concentrazioni di questi composti sono comparabili a quelle utilizzate in altri studi per altri tipi di cellule (Ross, Go K 1984).

Sia il Sandoz che il Progesterone sono in grado di inibire fortemente l'esterificazione del colesterolo come dimostra l'accumulo di  $^{14}\text{C}$ -CE in cellule CLL e ALL stimulate con PHA (fig 3A e 3D rispettivamente) e incubate con medium contenente  $^{14}\text{C}$ -oleato. L'inibizione dell'esterificazione del colesterolo era evidente subito dopo sei ore dal trattamento con i farmaci ed era seguita da una significativa riduzione dell'incorporazione di  $^3\text{H}$ - thymidine (fig. 3, B e C) dopo 48h di trattamento.

In questi esperimenti, la vitalità cellulare (valutata con il Trypan blu test), è stata maggiore del 95% suggerendo che l'effetto inibitorio dei due farmaci comporta un blocco della crescita piuttosto che morte cellulare.



**Figure 3. SaH e Pg determinano inibizione della crescita cellulare.**

Le cellule di ALL e CLL sono state incubate con  $^{14}\text{C}$ -oleate (A e C)

e con  $^3\text{H}$ -Thimidine (B e D) sei ore prima di ogni tempo di incubazione.

Pg ( $10\mu\text{M}$ ) o Sandoz 58035 ( $4\mu\text{M}$ ) venivano aggiunti alle cellule insieme al PHA al tempo zero e poi venivano raccolte 6h e 48h dopo la stimolazione. I risultati rappresentano la media  $\pm$  SE dei risultati ottenuti in esperimenti condotti in triplicato.

\* indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) comparate con cellule non trattate.

### ***Effetti dell'Everolimus sull'esterificazione del colesterolo.***

Dai nostri risultati è emerso che due differenti inibitori dell'esterificazione del colesterolo inibiscono la proliferazione in cellule ALL e CLL confermando i nostri precedenti risultati (Batetta, Mulas 2003; 1999) e supportando l'ipotesi che l'esterificazione del colesterolo gioca un ruolo chiave nella crescita delle cellule leucemiche.

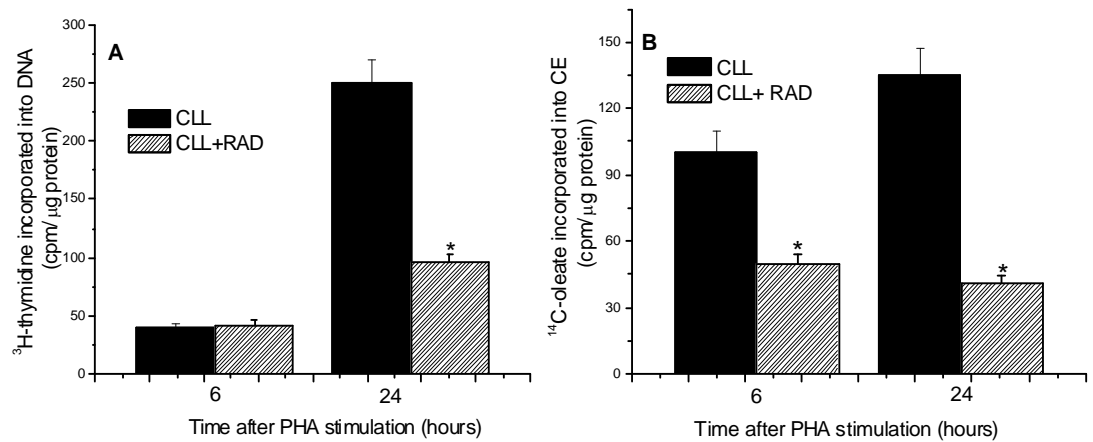
Un'ulteriore conferma a questa ipotesi è stato lo studio degli effetti dell'Everolimus sull'esterificazione del colesterolo e sulla proliferazione cellulare in cellule CLL stimulate con PHA. L'everolimus è un potente inibitore della proliferazione cellulare che induce un arresto del ciclo cellulare non solo nei linfociti normali ma anche nelle cellule maligne (Majewski, Korecka 2000).

Come ci aspettavamo i trattamenti con l'Everolimus hanno determinato una drammatica soppressione della crescita cellulare, ma sorprendentemente l'inibizione dell'incorporazione dell'<sup>3</sup>H-thymidine (fig 4,A) era preceduta da una diminuzione significativa dell'esterificazione del colesterolo (fig 4,B).

Gli effetti dell'Everolimus sull'esterificazione del colesterolo sono stati confermati anche dalla rivelazione dei lipid droplets citoplasmatici con la colorazione Oil- red O.

L'Everolimus (fig. 5) inibisce l'accumulo di esteri del colesterolo in cellule CLL come il progesterone. Questi risultati indicano che le cellule leucemiche aumentano il tasso di esterificazione del colesterolo in risposta agli stimoli di crescita e che l'inibizione di questa risposta metabolica diminuisce la loro proliferazione.

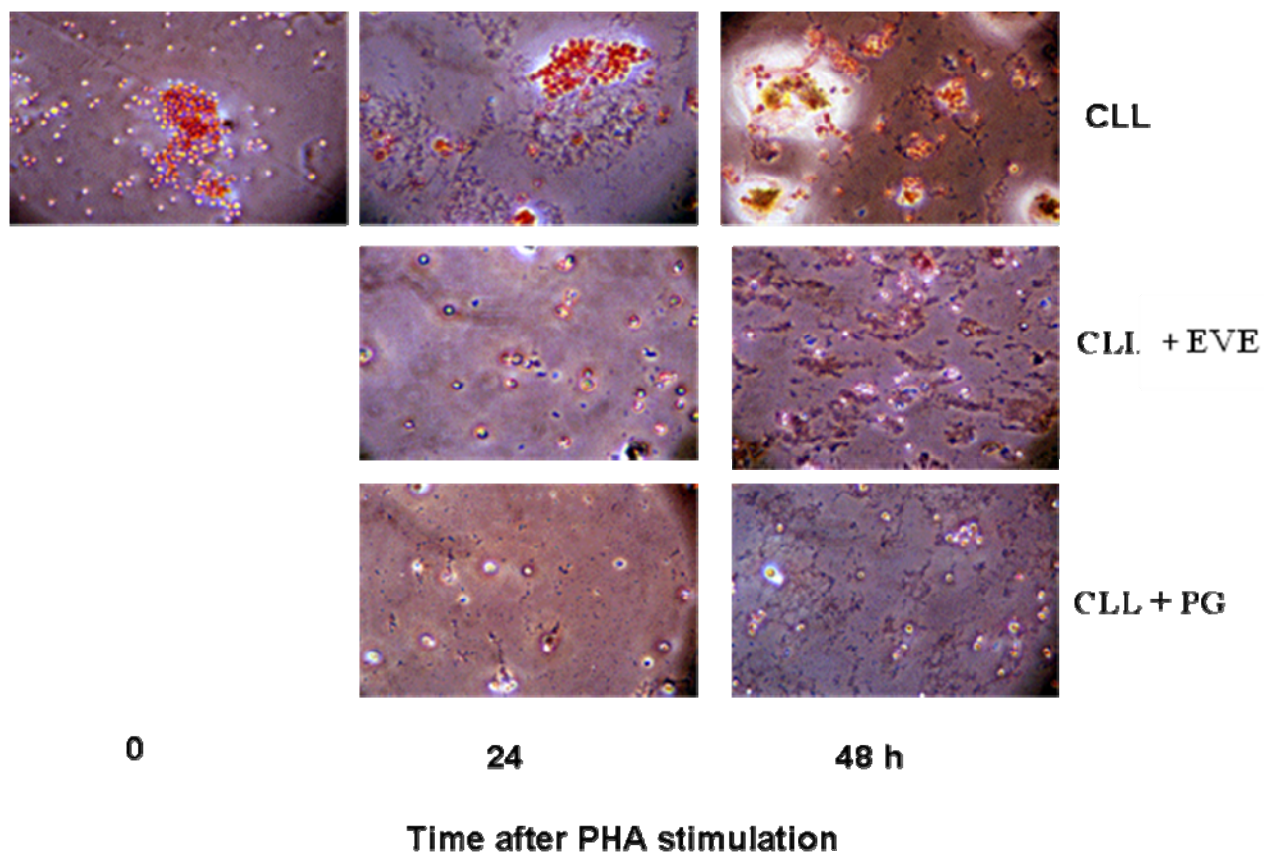




**Fig.4. Everolimus induce inibizione dell'esterificazione del colesterolo.**

Le cellule di CLL sono state incubate con  $^{14}\text{C}$ -oleate (A) e con  $^3\text{H}$ -Thimidine (B) sei ore prima di ogni tempo di incubazione. RAD (20nM) veniva aggiunto alle cellule insieme al PHA al tempo zero e poi venivano raccolte 6h e 48h dopo la stimolazione. I risultati rappresentano la media  $\pm$  SE dei risultati ottenuti in esperimenti condotti in triplicato.

\* indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) comparate con cellule non trattate.



**Fig 5. Lipid droplets in CLL trattate con EVE e Pg**

Le cellule di CLL venivano incubate nei tempi indicati con EVE e Pg. Poi colorate con "Oil red O" (per i lipidi neutri) e decolorate con ematossilina (per i nuclei).

### ***Analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR***

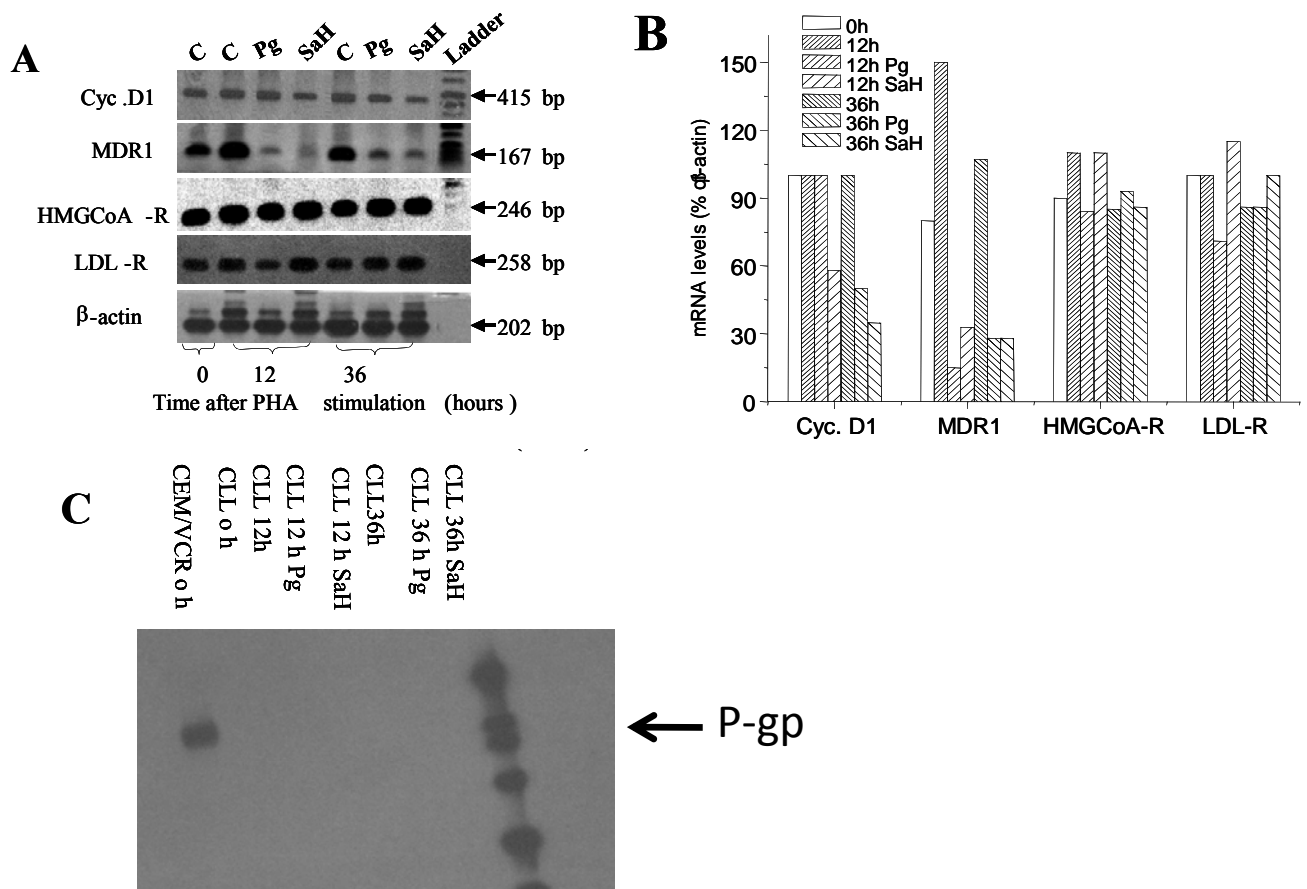
Abbiamo valutato gli effetti degli inibitori dell'esterificazione del colesterolo nell'espressione della cyclin D1 (Cyc. D1) e di altri geni coinvolti nel traffico intracellulare del colesterolo: HMGC<sub>o</sub>A-R, LDL receptor (LDL-R) e MDR1. Come mostrato nella fig. 6A, Pg e SaH hanno causato solo una moderata riduzione dei livelli di mRNA della Cyc. D1 e nessun cambiamento per l'LDL-R e l'HMGC<sub>o</sub>A-R mRNA.

Nelle cellule CLL non stimolate i livelli di espressione dell'mRNA del gene MDR1 risultano maggiormente espressi rispetto ai trattati (Pg-SaH) e il trattamento con PHA determina un ulteriore aumento dell'espressione. Siccome l'espressione dell'MDR1 è regolata sia da livelli trascrizionali che post-trascrizionali (Yague, Armesilla 2003), abbiamo voluto valutare se l'aumento dell'espressione genica dell'MDR1 è seguito da un aumento dell'espressione della P-glicoproteina.

Nonostante l'evidente aumento dei livelli di mRNA dell'MDR1 nelle cellule CLL stimolate con PHA non abbiamo riscontrato un aumento dell'attività della P-gp come dimostrato dall'accumulo intracellulare di <sup>3</sup>[H]vinblastine (Fig.7).

Inoltre, analisi di Western Blot con il rabbit anti-P-gp pyclonal antibody H241 hanno rivelato l'assenza dell'espressione della P-gp sia in cellule non stimolate che in cellule trattate con il PHA.

Risultati positivi riguardo l'attività e l'espressione proteica della Pgp sono stati ottenuti con una linea cellulare resistente alla Vincristina, confermando che i risultati ottenuti nelle cellule CLL non erano un artefatto della tecnica.



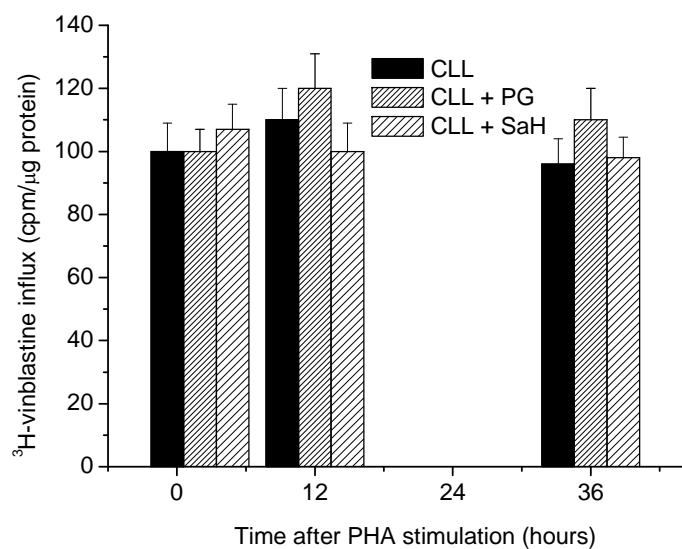
**Fig.6. I livelli di espressione dell'mRNA del gene MDR1 nelle cellule di pazienti CLL diminuiscono dopo il trattamento con inibitori dell'esterificazione del colesterolo.**

Le cellule di CLL erano stimulate alla crescita con PHA in presenza o in assenza di Progesterone (Pg) (10 $\mu$ M) o SaH 58035 (4 $\mu$ M). Le cellule venivano raccolte alle 12h e alle 36h secondo il trattamento.

(A) RT-PCR relativo a Cyclin D-1 (CycD1), MDR1, HMGCoA-R, LDL-R e  $\beta$ -actin

(B) Quantizzazione dei valori dimostrati in fig A standardizzati con la  $\beta$ -actina.

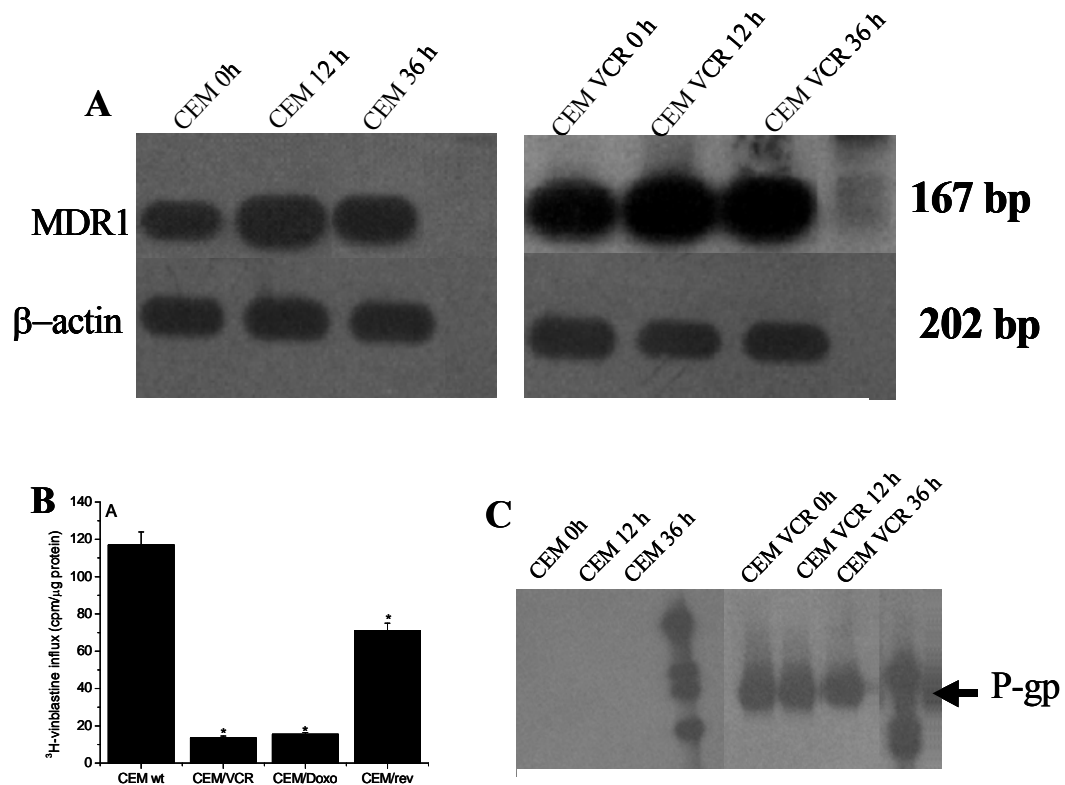
(C) Analisi di Western Blot di proteine estratte da cellule CLL trattate con Pg e SaH. Si nota l'assenza di P-glycoprotein sia nelle cellule trattate che nei controlli.



**Fig. 7. L'attività di efflusso dei farmaci in cellule di CLL.**

Al tempo indicato  $2 \times 10^5$  cells/ml sono state incubate per due ore con 3.7 KBq/ml [ $^3$ H] vinblastine sulphate poi lavate per tre volte con PBS, idrolizzate con 0.1N NaOH e analizzate per le proteine e per il contenuto di [ $^3$ H] vinblastine.

I risultati rappresentano la media  $\pm$  SE dei risultati ottenuti in esperimenti condotti in triplicato.



**Fig.8 Livelli di espressione dell'MDR1 e della P-gp e accumulo di [<sup>3</sup>H]Vinblastina in CEM e CEM-VCR.**

(A) Livelli di espressione dell'mRNA dell'MDR1 studiati in CEM e CEM/VCR mediante RT-PCR utilizzando la  $\beta$ -Actina come controllo.

(B) Accumulo intracellulare [<sup>3</sup>H]Vinblastina/ $\mu$ g proteina.

(C) Western Blot per P-glycoprotein.

## ***Discussione***

E' ormai indiscusso che il metabolismo del colesterolo gioca un ruolo chiave in molte patologia maligne (Chen, Kandutsch 1978) tuttavia per migliorare le nostre conoscenze abbiamo studiato il ruolo del pools intracellulare di colesterolo libero e degli esteri nelle cellule leucemiche.

In questo studio, è emerso che le cellule ALL e CLL hanno alti livelli basali di esteri del colesterolo rispetto ai linfociti normali e rispondono agli stimoli mitogenici aumentando il tasso di esterificazione del colesterolo con

l'accumulo degli esteri sottoforma di lipid droplets nel citoplasma. Le alterazioni del pools intracellulare del colesterolo sono accompagnate da bassi livelli di HDL-C nel siero di pazienti con ALL e CLL.

Questi risultati in accordo con i precedenti risultati (Dessi Pulisci 1991; Dessi, Batetta 1995; 1994) suggeriscono che alti livelli di esteri del colesterolo intracellulare e bassi livelli di HDL-C possono rappresentare un profilo metabolico distinto nei processi proliferativi, includendo ALL e CLL.

Nel nostro lavoro noi abbiamo messo in evidenza il legame tra il metabolismo del colesterolo e la proliferazione delle cellule leucemiche attraverso i farmaci inibitori dell'esterificazione; infatti inibendo l'esterificazione con i farmaci SaH e Pg si ha una riduzione dell'accumulo di lipid droplets nel citoplasma e in concomitanza un arresto della crescita in queste cellule. Questi due farmaci che bloccano l'esterificazione del colesterolo, con meccanismi diversi, sono quindi entrambi capaci di causare l'inibizione della crescita.

Inoltre l'inibizione della crescita attraverso l'Everolimus, un conosciuto agente antiproliferativo, è stata anticipata da un arresto dell'attività dell'acat, che ha preceduto di diverse ore l'inibizione della sintesi del DNA nelle cellule CLL. Questi risultati sono quindi di supporto all'ipotesi che l'esterificazione del colesterolo e l'accumulo degli esteri possono contribuire a una regolazione della crescita delle cellule leucemiche.

Come è noto il pool intracellulare di FC e il pool di CE sono strettamente regolati e il colesterolo libero nelle membrane cellulari regola diversi processi: dalla biosintesi de novo del colesterolo alla trasduzione del segnale (Lange et al 1996; Goldestein, Brown 1985, Fielding, Fielding 1999, Simons, Toomre 2000); inoltre il colesterolo è particolarmente abbondante nei domini di membrana specializzati chiamati rafts e caveole, dove si trovano diverse proteine coinvolte nella trasduzione di segnali mitogenici extracellulari (Fielding, Fielding 1999, Simons, Toomre 2000). Diversi studi hanno dimostrato che i livelli di colesterolo libero nelle rafts hanno un importante effetto nella funzione delle proteine associate alle rafts, e che la rimozione del colesterolo è capace di attivare l'EGF recettore o la cascata delle MAP chinasi in assenza di altri mitogeni extracellulari (Furuchi, Anderson 1998; Lambert et al 2006). Il traffico del colesterolo è un processo altamente regolato (Lange, Steck 1996; Lange et al 1997) che gioca un ruolo fondamentale nel mantenere i livelli di colesterolo nelle rafts e in altri compartimenti di membrana. Contrariamente, gli esteri del colesterolo sono sempre stati considerati niente altro che una forma di conservazione del colesterolo e l'accumulo di CE nel citoplasma come un cosa necessaria per evitare gli effetti tossici dell'eccesso di FC nelle cellule. Tuttavia recenti lavori (Batetta, Mulas 2003; Batetta, Pani 1999) ci hanno



suggerito un nuovo ruolo del processo di esterificazione del colesterolo, e i nostri risultati, supportano questo nuovo ruolo degli EC evidenziando una chiara associazione tra la proliferazione cellulare e l'esterificazione del colesterolo nella crescita di cellule stimulate; inoltre è stato dimostrato che l'inibizione dell'esterificazione causa arresto della crescita.

Tuttavia noi non conosciamo gli esatti meccanismi coinvolti, ma possiamo ipotizzare che il pool di esteri del colesterolo, possa anche essere una parte integrale dell'apparato cellulare che regola l'abbondanza di FC nei domini di membrana come le rafts e che l'esterificazione del colesterolo, potrebbe rappresentare uno step chiave delle vie che modulano i livelli di colesterolo libero di membrana, in risposta agli stimoli extracellulari.

Un altro interessante risultato di questo studio è che il trattamento delle cellule ALL e CLL con gli inibitori dell'esterificazione del colesterolo causa una evidente diminuzione dell'espressione dell'mRNA del gene MDR1.

I nostri dati indicano chiaramente che l'esterificazione del colesterolo e i livelli di mRNA del gene MDR1 sono entrambi associati alla proliferazione cellulare nelle cellule leucemiche.

Il ruolo del metabolismo del colesterolo durante la crescita delle cellule è ben conosciuto e documentato e può essere rilevante in questo contesto (Chen, Kandutsch 1978).

E' stato descritto estesamente il ruolo per l' MDR1-PGP nel traffico intracellulare dei lipidi di membrana, includendo il trasporto del colesterolo dalle plasmamembrane al ER, il sito dell'esterificazione del colesterolo da parte dell'ACAT.

In accordo con la nostra ipotesi, l'MDR1 può influenzare il segnale raft-dependent regolando almeno in parte l'ammontare di

colesterolo libero che viene trasportato dalle rafts-membrane al reticolo endoplasmatico.

Chiaramente anche se sono necessari ulteriori studi per determinare l'importanza fisiologica delle funzioni aggiuntive della proteina Pgp-MDR1i nostri dati ,nel presente studio, indicano che CE e l'espressione genica dell' MDR-1 possono rappresentare un importante elemento di controllo della proliferazione delle cellule leucemiche..

## ***Conclusioni e Prospettive Future***

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati i fibroblasti di pterigio primario e i linfomonociti di pazienti leucemici, come modello sperimentale per lo studio delle alterazioni del metabolismo del colesterolo.

I dati ottenuti, fanno ritenere che la correzione dello status lipidico intracellulare potrebbe svolgere un ruolo importante per il trattamento di queste patologie.

Inoltre, i risultati ottenuti in questo lavoro, suggeriscono una correlazione funzionale tra l'esterificazione del colesterolo, l'espressione genica dell'MDR1 ed il tasso di crescita dello pterigio e delle cellule leucemiche.

Chiaramente sarebbero necessarie ulteriori ricerche per definire l'importanza fisiologica delle funzioni aggiuntive della proteina Pgp e del gene corrispondente MDR1.

Le proteine coinvolte nel ciclo degli esteri del colesterolo, infatti, potrebbero rappresentare degli elementi importanti nella proliferazione cellulare e nella progressione di queste due patologie..

Per concludere, i nostri risultati supportano il ruolo potenziale come medicazioni a livello topico dei farmaci antiproliferativi EVE e PIO allo scopo di prevenire ed inibire la crescita dello pterigio agli stadi iniziali della patologia, probabilmente attraverso un meccanismo consistente nella modulazione del metabolismo degli esteri.

In caso di rimozione chirurgica incompleta dello pterigio, il trattamento con questi farmaci potrebbe dunque

prevenire un'ulteriore progressione del processo patologico o l'insorgenza di eventuali recidive.

L'accumulo di CE e l'espressione genica dell'MDR1 invece, si possono considerare un importante elemento per il controllo della crescita delle cellule leucemiche e potrebbero rappresentare un nuovo approccio farmacologico nella terapia del cancro.

## **Bibliografia**

Abrami, L. & van Der Goot, F.G. Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J Cell Biol* 147, 175-184 (1999).

Allan, D. Mapping the lipid distribution in the membranes of BHK cells (mini-review). *Mol Membr Biol* 13, 81-84 (1996).

Anderson RCW. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 199-225, 1998.

Barnes DJ, Melo JV. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol.* 2002;108:180–202.

Batetta B, Mulas MF, Petruzzo P, Putzolu M, Bonatesta RR, Sanna F, Cappai A, Brotzu G, Dessì S. Opposite pattern of MDR1 and caveolin-1 gene expression in human atherosclerotic lesion and proliferating human smooth muscle cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58: 1-8, 2001.

Batetta B, Mulas MF, Sanna F, Putzolu M, Bonatesta RR, Gasperi-Campani A, Roncuzzi L, Baiocchi D, and Dessi S. Role of cholesterol ester pathway in the control of cell cycle in human aortic smooth muscle cells. *FASEB J.* 2003; 6:746-748.

Batetta B, Pani A, Putzolu M, Sanna F, Bonatesta R, Piras S, Spano O, Mulas MF, and Dessi S. Correlation between cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of

cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Prolif.* 1999; 32: 49-61.

Batetta B, Pani A, Putzolu M, Sanna F, Bonatesta RR, Piras S, Spano O, Mulas MF, Dessì S. Correlation between cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Proliferation*, 32: 49-61, 1999 (b).

Batetta B, Pani A, Putzolu M, Sanna F, Bonatesta RR, Piras S, Spano O, Mulas MF, Dessì S. Correlation between cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Proliferation*, 32: 49-61, 1999 (b).

Batetta, B. et al. Correlation between cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Prolif* 32, 49-61 (1999).

Batetta, B. et al. Opposite pattern of MDR1 and caveolin-1 gene expression in human atherosclerotic lesions and proliferating human smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 58, 1113-1120 (2001).

Batetta, B. et al. Role of cholesterol ester pathway in the control of cell cycle in human aortic smooth muscle cells. *Faseb J* 17, 746-748 (2003).

Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membrane, cell and

blood. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96: 11041-11048, 1999.

Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. J. Biol. Chem., 255: 9344-9352, 1980.

Casey PJ, Seabra MC. Protein Prenyltransferases. J. Biol. Chem., 271: 5289-5292, 1996.

Casey PJ, Solski PA, Der CJ, and Buss JE. P21 ras is modified by a farnesyl isoprenoid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 8323-8327, 1989.

Chait A, Bierman EL, and Albers JJ. Low-density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblast. J. Clin. Invest. 64: 1309-1319, 1979.

Chang TY, Chang CCY, Cheng D. Acyl-coenzymeA cholesterol acyltransferase. Annu. Rev. Biochem., 66:613-638. 1997.

Chen HW, Kandutsch AA and Heininger HJ. The role of cholesterol in malignancy. Prog. Exp. Tumor Res 1978; 22: 275-316.

Chen PL, Cheng YW, Chiang CC, Tseng SH, Chau PS, Tsai YY. Hypermethylation of the p16 gene promoter in pterygia and its association with the expression of DNA methyltransferase 3b. MolVis. 2006;12:1411-1416.

Chen, J.K., Tsai, R.J. & Lin, S.S. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 30A, 243-248 (1994).

Cherukuri, A., Dykstra, M. & Pierce, S.K. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 14, 657-660 (2001).

Clayman RV, Lyman EB, Buja LM, Spady DK, and Dietschy JM. Renal cell carcinoma in the Wistar-lewis rat: a model for studying the mechanism of cholesterol acquisition by a tumor in vivo. *Cancer Research*, 46: 2958-2963, 1986.

Clayton, P.T. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* 78, 185-189 (1998).

Clear, A.S., Chirambo, M.C. & Hutt, M.S. Solar keratosis, pterygium, and squamous cell carcinoma of the conjunctiva in Malawi. *BrJ Ophthalmol* 63, 102-109 (1979).

Coroneo, M.T., Di Girolamo, N. & Wakeheld, D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol* 10, 282-288 (1999).

Debry P, Nash EA, Neklason Dw and Metherall JE. Role of multidrug resistance p-glycoproteins in cholesterol esterification. *J Biol Chem*, 272: 1026-1031, 1997.

Debry P, Nash EA, Neklason Dw and Metherall JE. Role of multidrug resistance p-glycoproteins in cholesterol esterification. *J Biol Chem*, 272: 1026-1031, 1997.



Debry P, Nash EA, Neklason, DW, and Metherall JE. Role of multidrug resistance p-glycoproteins in cholesterol esterification. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:1026-1031.

Debry, P., Nash, E.A., Neklason, D.W. & Metherall, J.E. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification. *J Biol Chem* 272, 1026-1031 (1997).

Dejneka, N.S. et al. Systemic rapamycin inhibits retinal and choroidal neovascularization in mice. *Mol Vis* 10, 964-972 (2004).

Dessi A, Batetta B, Spano O, Sanna F, Tonello M, Giacchino M, Tessitore L, Costelli P, Baccino F, Madon E, and Pani P. Clinical remission is associated with restoration of normal high-density lipoprotein cholesterol levels in children with malignancies. *Clin Sci.* 1995; 89:505-510.

Dessi S, Batetta B, Anchisi C, Pani P, Broccia G, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM. Cholesterol metabolism in normal and neoplastic cell proliferation. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 2: 563-568, 1991 (a).

Dessi S, Batetta B, Anchisi C, Pani P, Costelli P, Tessitore L, Baccino FM. Cholesterol metabolism during the growth of a rat ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Br. J. Cancer*, 66: 787-793, 1992 (a).

Dessi S, Batetta B, Carrucciu A, Pulisci D, Laconi S, Fadda AM, Anchisi C, Pani P. Variations of serum lipoproteins during cell proliferation induced by lead nitrate. *Exp. Mol. Pathol*, 51: 97-102, 1989.

Dessi S, Batetta B, Laconi E, Ennas C, Pani P. Hepatic cholesterol in lead nitrate induced liver hyperplasia. *Chem Biol Interact*, 48: 271-279, 1984.

Dessi S, Batetta B, Muntoni Sa, Spano O, Pulisci D, Accogli P, Pani P, Broccia G. Plasma lipoprotein pattern in humans with hematologic neoplasms. *Recent Advances in Atherosclerosis Research*. S.Muntoni (ed.), Cagliari, Italy, 172-175, 1990 (a).

Dessi S, Batetta B, Pani A, Spano O, Sanna F, Putzolu M, Pani P. Role of cholesterol synthesis and esterification in the growth of CEM and MOLT4 lymphoblastic cells. *Biochem. J.*, 321: 603-608, 1997 (a).

Dessi S, Batetta B, Pani A, Spano O, Sanna F, Putzolu M, Pani P. Role of cholesterol synthesis and esterification in the growth of CEM and MOLT4 lymphoblastic cells. *Biochem. J.*, 321: 603-608, 1997.

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Accogli P, Anchisi C, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Broccia G, Pani P. Cholesterol metabolism and proliferative processes. *Modulating Factors in Multistage Chemical Carcinogenesis*. Columbano A, Feo F, Pascale R, Pani P (eds.), Plenum Press, New York, U.S.A., pp. 311-320, 1991.

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Accogli P, Broccia G, Pani P. Total and HDL cholesterol in human hematologic neoplasms. *Int J Hematol*, 54: 483-486, 1991 (b).

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Accogli P, Pani P, Broccia G. Total and HDL cholesterol in human hematologic neoplasms. *Int. J Hematol* 1991; 54: 483-486.

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Anchisi C, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Aroasio E, Pani P. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with HDL-cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer*, 73: 253-258, 1994.

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Anchisi C, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Aroasio E, Pani P. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer* 1994; 15: 253-258.

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Cherchi R, Lanfranco G, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Anchisi C, Pani P. Altered pattern of lipid metabolism in patients with lung cancer. *Oncology*, 49: 436-444, 1992 (b).

Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Cherchi R, Lanfranco G, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Anchisi C, Pani P. Altered pattern of lipid metabolism in patients with lung cancer. *Oncology* 1992; 49: 436-441.

Dessi S, Chiodino C, Batetta B, Fadda AM, Anchisi C, Pani P. Hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase, cholesterogenesis and serum lipoproteins in liver regeneration after partial hepatectomy. *Exp. Mol. Pathol.*, 44: 169-176, 1986.

Dessi, S. et al. Altered pattern of lipid metabolism in patients with lung cancer. *Oncology* 49, 436-441 (1992).

Dessi, S. et al. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high—density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer* 73, 253-258 (1994).

Dessi, S. et al. Role of cholesterol synthesis and esterification in the growth of CEM and MOLT4 lymphoblastic cells. *Biochem J* 321 ( Pt 3), 603-608 (1997).

Detels, R. & Dhir, S.P. Pterygium: a geographical study. *Arch Ophthalmol* 78, 485-491 (1967). Saw, S.M. & Tan, D. Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol* 6, 219-228 (1999).

Drab, M. et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452 (2001).

Dushku, N. & Reid, T.W. Immunohistochemical evidence that human pterygia originate from an invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells. *Curr Eye Res* 13, 473-481 (1994).

Dushku, N., Hatcher, S.L., Albert, D.M. & Reid, T.W. p53 expression and relation to human papillomavirus infection in pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Arch Ophthalmol* 117, 1593-1599 (1999).

Dushku, N., John, M.K., Schultz, G.S. & Reid, T.W. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 119, 695-706 (2001).

Edwards PA, Ericsson J. Sterol and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem*, 68: 157-185, 1999.

Eisen, H.J. et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac—transplant recipients. *N Engl J Med* 349, 847-858 (2003).

Enroth, C. [Pterygium and heredity.]. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 29, 139-142 (1951).

Fearon E. Tumor-suppressor genes. In: Vogelstein, B, Kinzler KW, eds. *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill Health Professional; 1998;229–240.

Fielding CJ, Bist A, Fielding PE. Intracellular cholesterol transport in synchronised human skin fibroblast. *Biochemistry*, 38: 2506-2513, 1999.

Fielding CJ, Fielding PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; 1529: 210-222.

Fielding PE, Fielding CJ. Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae and caveolae. *Biochemistry*. 35: 14932-14938, 1996.

Fielding, C.J. & Fielding, P.E. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta* 1529, 210-222 (2000).

Furuchi T, Anderson RGW. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem*, 1998; 273: 21099-21104.

Furuchi, T. & Anderson, R.G. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem* 273, 21099—21104 (1998).

Galbiati, F. et al. Caveolin—3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t—tubule abnormalities. *J Biol Chem* 276, 21425-21433 (2001).

Ghassibe, M. et al. Six families with van der Woude and/or popliteal pterygium syndrome: all with a mutation in the IRF6 gene. *J Med Genet* 41, e15 (2004).

Glomset JA. The plasma lecithins: cholesterol acyltransferase reaction. *J. Lipid Res.*, 9, 155-167, 1968.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW, and W. J. Schneider. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985; 1: 1-39.

Graf GA, Connell PM, van der Westhuyzen DR et al. The class B, type 1 scavenger receptor promote the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J. Biol. Chem.*, 274:12043-12048, 1999.

Graf GA, Connell PM, van der Westhuyzen DR et al. The class B, type 1 scavenger receptor promote the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J. Biol. Chem.*, 274:12043-12048, 1999.

Habenicht AJR, Glomset JA, Ross R. Relationship of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and Swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.*, 255: 5134-5140, 1980.

Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141, 929-942 (1998).

Hecht, F. & Shoptaugh, M.G. Winglets of the eye: dominant transmission of early adult pterygium of the conjunctiva. *J Med Genet* 27, 392-394 (1990).

Hirst, L.W. The treatment of pterygium. *Surv Ophthalmol* 48, 145-180 (2003).

Holowka, D. & Baird, B. Fc(epsilon)RI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. *Semin Immunol* 13, 99-105 (2001).

Huntington JT, Shields JM, Der CJ, et al. Overexpression of collagenase1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasivemelanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growthfactor signaling. J Biol Chem. 2004;279:33168–33176.

Igarashi, M. et al. Characterization of an inhibitory effect of pioglitazone on balloon-injured vascular smooth muscle cell growth. *Metabo/ism* 50, 955-962 (2001).

Ikeda, H. & Sugiyama, Y. [Insulin resistance-reducing effect of a new thiazolidinedione derivative, pioglitazone]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 117, 335-342 (2001).

Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I. & Kabouridis, P.S. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 12, 23-34 (2000).

Jeong, J. & McMahon, A.P. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J C/in Invest* 110, 591-596 (2002).

Kandutsh AA, and Chen HW. Consequences of blocked sterol synthesis in cultured cells: DNA synthesis and membrane composition. *J. Biol. Chem.*, 252: 409-415, 1977.

Kennedy, M. et al. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 2483-2491 (1997).



Kholodenko, B.N., Hoek, J.B. & Westerhoff, H.V. Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends Cell Biol* 10, 173-178 (2000).

Kolesnick, R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 110, 3-8 (2002).

Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem.* 1996;98:195-201.

Kria, L., Ohira, A. & Amemiya, T. Growth factors in cultured pterygium fibroblasts: immunohistochemical and ELISA analysis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236, 702-708 (1998).

Krieger M. Charting the fate of the “good cholesterol”: Identification and characterization of the high density lipoprotein receptor SR-BI. *Ann, Rev. Biochem*, 68: 523-558, 1999.

Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11: 424-431, 1999.

Kurzchalia, T.V. & Parton, R.G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-431 (1999).

Kwon, Y.S. & Kim, J.C. Inhibition of corneal neovascularization by rapamycin. *Exp Mol Med* 38, 173-179 (2006).

Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S, Gniadecki R. Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol.* 2006 May;126(5):954-62

Lange Y and Steck TL. Quantitation of the pool of cholesterol associated with acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 272: 13103-13108, 1997.

Lange Y, and T. L. Steck. The role of intracellular cholesterol transport in cholesterol homeostasis. *Trends Cell Biol.* 1996; 6: 205-208.

Lange Y, Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic. *J. Biol. Chem.*, 193: 3411-3414, 1994.

Lange Y, Steck TL. Cholesterol homeostasis-modulation by amphiphiles. *J. Biol. Chem.*, 269: 29371-29374, 1994.

Lange Y, Ye J, and Chin J. The fate of cholesterol exiting lysosomes. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 17018-17022.

Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABCA1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J. Clin. Invest.*, 104: R25-R31, 1999.

Lesieur, C., Vecsey-Semjen, B., Abrami, L., Fivaz, M. & Gisou van der Goot, F. Membrane insertion: The strategies of toxins (review). *Mol Membr Biol* 14, 45-64 (1997).

London, E. & Brown, D.A. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 1508, 182-195 (2000).

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;341(14):1051-1062.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275 (1951).

Luker GD, Nilsson KR, Covey DF, Piwnicka-Worms D. Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane cholesterol. *J Biol Chem,* 274: 6979-6991, 1999.

Majewski M, Korecka M, Kossev P, Li S, Goldman J, Moore J, Silberstein LE, Nowell PC, Schuler W, Shaw LM, and Wasik MA. The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 4285-4290.

Marx, N., Schonbeck, U., Lazar, M.A., Libby, P. & Plutzky, J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83, 1097-1103 (1998).

Mazzone, T., Basheeruddin, K., Ping, L. & Schick, C. Relation of growth- and sterol-related regulatory pathways for low density lipoprotein receptor gene expression. *J Biol Chem* 265, 5145-5149 (1990).

Mendez AJ, Lin G, Wade DP, Lawn RM, Oram JF. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway *J. Biol. Chem.*, 276: 3158-3166, 2001.

Metherall JE, Li H, Waugh K. Role of multidrug resistance p-glycoproteins in cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 271: 2634-2640, 1996.

Metherall, J.E., Li, H. & Waugh, K. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 271, 2634-2640 (1996).

Minetti, C. et al. Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am J Pathol* 160, 265-270 (2002).

Mirre C, Monlauzeur L, Garcia M, Delgrossi MH, Le Bivic A. Detergens-resistant membrane microdomains from Caco-2-cells do not contain caveolin. *Am. J. Physiol.* 271: C887-C894, 1996.

Moran, D.J. & Hollows, F.C. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation. *Br J Ophthalmol* 68, 343-346 (1984).

Mukherjee, S. & Maxfield, F.R. Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking. *Traffc* 1, 203-211 (2000).

Nashan, B. Review of the proliferation inhibitor everolimus. *Expert Opin Investig Drugs* 11, 1845-1857 (2002).

Nolan, T.M. et al. The role of ultraviolet irradiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium. *Am J Pathol* 162, 567-574 (2003).

Nolan, T.M., Di Girolamo, N., Coroneo, M.T. & Wakefield, D. Proliferative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 110-113 (2004).

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E. & Lisanti, M.P. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273, 5419-5422 (1998).

Pani, A. et al. MDR1, cholesterol certification and cell growth: a comparative study in normal and multidrug-resistant KB cell lines. *Cell Mol Life Sci* 57, 1094-1102 (2000).

Pape ME, Schultz PA, Rea TJ, De Mattos RB, Jieff K, Bisgaier CL, Newton RS, Krause BR. Tissue specific changes in acyl-CoA: cholesterol acyltransferase. *J. Lipid Res.*, 36: 823-838, 1995.

Parsons SK, Skapek SX, Neufeld EJ, Kuhlman C, Young ML, Donnelly M, Brunzell JD, Otvos JD, Sallan SE, and Rifai N. Asparaginase-Associated Lipid Abnormalities in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 1997; 89:1886-1895.

Peiretti, E. et al. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit altered lipid metabolism characteristics. *Exp Eye Res* 83, 536-542 (2006).

Peiretti, E., Dessi, S., Putzolu, M. & Fossarello, M. Hyperexpression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A-reductase in human pinguecula and primary pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 3982-3985 (2004).

Pelkmans, L. & Helenius, A. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311-320 (2002).

Petruzzo, P. et al. Lipid metabolism and molecular changes in normal and atherosclerotic vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22, 31-36 (2001).

Polekova L, Barancik M, Mrazova T, Pirker R, Wallner J, Sulova Z, Breier A. Adaptation of mouse leukemia cells L1210 to vincristine. Evidence for expression of P-glycoprotein. *Neoplasma*, 39: 73-77, 1992.

Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K. & Horber, J.K. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148, 997-1008 (2000).

Pterygium and its causes. *Lancet* 1, 1392 (1984).

Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1535–1548.

Rao KN, Kottapally S, Eskander ED, Shinozuka H, Dessi S, and Pani P. Acinar cell carcinoma of rat pancreas: regulation of cholesterol esterification. *Br J Cancer*. 1986; 54, 305-310.

Razani, B. & Lisanti, M.P. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J C/in Invest* 108, 1553-1561 (2001).

Razani, B. et al. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol* 22, 2329-2344 (2002).

Rivera, J., Arudchandran, R., Gonzalez-Espinosa, C., Manetz, T.S. & Xirasagar, S. A perspective: regulation of IgE receptor—mediated mast cell responses by a LAT-organized plasma membrane- localized signaling complex. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 137-141 (2001).

Ross AC, Go K, Heider J, Rothblat GH. Selective inhibition of acylCoA:cholesterol acyltransferase by compound 58-035. *J. Biol. Chem* 1984; 258: 815-819.

Roy, S. et al. Dominant-negative caveolin inhibits H—Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol* 1, 98-105 (1999).

Sarayba, M.A. et al. Inhibition of corneal neovascularization by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand. *Exp Eye Res* 80, 435-442 (2005).

Saw, S.M. & Tan, D. Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol* 6, 219-228 (1999)

Schmidt RA, Schneider CJ, Glomset JA. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell protein. *J. Biol. Chem.*, 259: 10175-10180, 1984.

Schuler, W. et al. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 64, 36-42 (1997).

Sedan, J. [Pinguecula, pterygium and trachoma]. *Rev Int Trach* 42, 470-474 (1965).

Sheets, E.D., Holowka, D. & Baird, B. Membrane organization in immunoglobulin E receptor signaling. *Curr Opin Chem Biol* 3, 95-99 (1999).

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):31-9.

Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39 (2000).



Siperstein MD. Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 2: 65-69, 1970.

Siperstein MD. Role of cholesterologenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J. Lipid Res.*, 25: 1462-1468, 1984.

Smart EJ, Ying Y, Conrad PA. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Biol. Chem.*, 127: 1185-1197, 1994.

Solomon A, Grueterich M, Li DQ, Meller D, Lee SB, Tseng SC. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in pterygium body fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:573-580.

Sowa, G., Pypaert, M. & Sessa, W.C. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14072-14077 (2001).

Spandidos, D.A., Sourvinos, G., Kiaris, H. & Tsampanlakis, J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol* 81, 493-496 (1997).

Tabas, I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 110, 905-911 (2002).

Tall, A.R., Costet, P. & Wang, N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest* 110, 899-904 (2002).

Tan, D.T., Chee, S.P., Dear, K.B. & Lim, A.S. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol* 115, 1235-1240 (1997).

Tan, D.T., Lim, A.S., Goh, H.S. & Smith, D.R. Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol* 123, 404-405 (1997).

Tan, D.T., Liu, Y.P. & Sun, L. Flow cytometry measurements of DNA content in primary and recurrent pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1684-1686 (2000).

Taylor, H.R. The biological effects of UV-B on the eye. *Photochem Photobiol* 50, 489-492 (1989).

Taylor, H.R. Ultraviolet radiation and pterygium. *Jama* 247, 1698 (1982).

Taylor, H.R. Ultraviolet radiation and the eye: an epidemiologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 87, 802-853 (1989).

Threlfall, T.J. & English, D.R. Sun exposure and pterygium of the eye: a dose-response curve. *Am J Ophthalmol* 128, 280-287 (1999).

Uittenbogaard A, Ying Y and Smart EJ. Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. *J Biol Chem*, 273: 6525-6532,1998.

Van der Goot, F.G. & Harder, T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 13, 89-97 (2001).

Van Meer, G. Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* 5, 247-275 (1989).

Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1(collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1996;6:391-411.

Wakino, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275, 22435-22441 (2000).

Witte LD, Cornicelli JA, Miller RW, Goodman DS. Effects of platelet-derived and endothelial cell-derived growth factors on the low density lipoprotein receptor pathway in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem*, 257: 5392- 5401, 1982.

Wong YW, Chew J, Yang H, Tan DT, Beuerman R. Expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in pterygium tissue. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:769-772.

Wu C, Butz S, Ying Y, Anderson RGW. Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem*, 272: 3554- 3559, 1997.

Xu, K., Williams, R.M., Holowka, D. & Baird, B. Stimulated release of fluorescently labeled IgE fragments that efficiently accumulate in secretory granules after endocytosis in RBL-2H3 mast cells. *J Cell Sci* 111 ( Pt 16), 2385-2396 (1998).

Yague E, Armesilla AL, Harrison G, Elliott J, Sardini A, Higgins CF, Raguz S. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J Biol Chem*. 2003; 278(12): 10344-10352.

Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C. & Tsien, R.Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296, 913-916 (2002).

Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanism and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem*, 65: 241-269, 1996.

## Ringraziamenti

La presente tesi, oltre che la testimonianza di un'attività di ricerca svolta nei tre anni di dottorato, è anche un'occasione per ringraziare quanti mi hanno sostenuto ed i colleghi con i quali condivido discussioni scientifiche, ore di lavoro (ma anche di divertimento), preoccupazioni e risultati.

Sono molte le persone che ho avuto modo di incontrare in questo mio percorso che, iniziato nel 2006, si conclude oggi con il presente documento.

Desidero ringraziare tutti quelli che hanno gentilmente accettato di prestare la loro collaborazione e, in particolare, quanti hanno contribuito a fornire, per le diverse competenze e conoscenze, la documentazione e le informazioni base necessarie per lo sviluppo di questo lavoro.

Un ringraziamento speciale, infine, a tutti i miei cari.

Claudia