



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTA' di SCIENZE MM.FF.NN.

CORSO di LAUREA MAGISTRALE in
BIOLOGIA APPLICATA ALLA BIOMEDICINA
Curriculum FISIOPATOLOGICO

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**“Effetti della rapamicina in un
modello *in vitro* di glioblastoma
multiforme”**

Relatori:

Prof. Francesco Fornai

Dott.ssa Michela Ferrucci

Candidato:

Larisa Ryskalin

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUZIONE	1
1.1 CENNI STORICI	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DEI GLIOMI	2
1.3 DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE DEI GLIOMI	4
1.4 IL GLIOBLASTOMA (GB)	6
1.4.1 <i>Epidemiologia e cenni clinici</i>	6
1.4.2 <i>Caratteristiche istopatologiche e molecolari del GB</i>	8
1.4.3 <i>Principali alterazioni genetiche associate al GB</i>	12
1.5 RUOLO DEL “SIGNALING” INTRACELLULARE NELLO SVILUPPO DEL GB	17
1.6 LA CELLULA DI ORIGINE DEL GB E L’IPOTESI DELLE CELLULE CANCEROGENE STAMINALI	24
1.6.1 <i>Marcatori tumorali nel GB</i>	26
1.7 IL COMPLESSO MOLECOLARE mTOR	28
1.8 L’AUTOFAGIA	29
1.9 GLIOBLASTOMA, mTOR e AUTOFAGIA	35

1.10 LA RAPAMICINA	39
2. INTRODUZIONE ALLO STUDIO	45
3. MATERIALI E METODI	48
3.1 COLTURE CELLULARI DI GLIOBLASTOMA UMANO (U87MG)	48
3.2 TRATTAMENTO CON RAPAMICINA	48
3.3 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE TRYPAN BLUE	49
3.4 ISTOCHIMICA E IMMUNOISTOCHIMICA	49
3.4.1 Colorazioni istologiche con Ematossilina-Eosina	49
3.4.2 Immunoistochimica	50
3.4.3 Analisi della vitalità cellulare dopo fissazione	51
3.4.4 Analisi morfometrica	52
3.4.5 Quantificazione dell'immunopositività in microscopia ottica	53
3.5 WESTERN BLOT E ANALISI DENSITOMETRICA	53
3.6 ANALISI IN MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)	55
3.7 CELLULE TUMORALI OTTENUTE DA PAZIENTI (FN e NMD)	56

3.8 CONTA CELLULARE DIRETTA SU CELLULE TUMORALI FN E NMD	56
3.9 MTT ASSAY	57
3.10 ANALISI MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO	58
3.11 DNA LADDERING	59
3.12 ESPERIMENTI <i>IN VIVO</i>	60
3.12.1 <i>Analisi dell'indice di proliferazione cellulare</i>	62
3.12.2 <i>Misurazione del volume della massa tumorale</i>	63
3.12.3 <i>Analisi della sopravvivenza dei topi nudi CD1</i>	63
3.13 ANALISI STATISTICA	63
4. RISULTATI	65
4.1 LA RAPAMICINA RIDUCE IL NUMERO DELLE CELLULE IN MODO DOSE-DIPENDENTE (U87MG)	65
4.2 LA RAPAMICINA INIBISCE L'INCREMENTO CELLULARE (U87MG)	65
4.3 LA RAPAMICINA INIBISCE L'INCREMENTO CELLULARE CHE AVVIENE NEL CONTROLLO IN MODO DOSE- E TEMPO-DIPENDENTE (FN e NMD)	66
4.4 LA RAPAMICINA INIBISCE LA CRESCITA DELLE CELLULE U87MG E DELLE FN e NMD CON UN SIMILE PROFILO DI TEMPO- E DOSE-DIPENDENZA	67

4.5 LA RAPAMICINA DETERMINA CITOTOSSICITA' ASSOCIATA AD AUTOFAGIA (U87MG)	68
4.6 LA RAPAMICINA INDUCE CAMBIAMENTI MORFOLOGICI NELLE CELLULE U87MG	69
4.7 LA RAPAMICINA MODIFICA L'IMMUNOPOSITIVITA' PER LA NESTINA, PER LA III-TUBULINA E PER LA GFAP NELLE CELLULE U87MG	70
4.8 LA RAPAMICINA RIDUCE L'IMMUNOPOSITIVITA' PER L' -SINUCLEINA NELLE CELLULE U87MG	71
4.9 LA RAPAMICINA INIBISCE LA CRESCITA TUMORALE NEL MODELLO <i>IN VIVO</i> DI GB	72
4.10 FIGURE RISULTATI	75
4.11 APPENDICE RISULTATI	98
5. <i>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</i>	101
6. <i>BIBLIOGRAFIA</i>	110