

Uso di colture di neuroblastoma in studi di neurotossicità

Emanuele Cacci, Paola Bonsi, Gabriella Augusti-Tocco, Stefano Biagioni

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza" - Piazzale Aldo Moro, 5- 00185 Roma

(Preparato per conto del Gruppo di Studio 04 "Colture Cellulari in Biochimica Clinica": coordinatore prof.ssa Vanna Chigorno)

ABSTRACT

Neuroblastoma lines as experimental models in neurotoxicological studies

The aim of this review is to point out some of the most important advantages deriving from the use of cell cultures as experimental model in toxicological studies. At the same time we indicate the limits of the experimental model and the strategies which allow to overcome them. The most widely used methods to evaluate cytotoxic effects of a given substance are also described. The action of molecules such as aflatoxin B₁, the gp120 envelope protein of HIV, and antitubercular drugs on neuroblastoma cell lines are described as examples of studies to evaluate the neurotoxicity of a given substance and to shed light on the mechanism underlying the toxic actions.

RIASSUNTO

Con questo contributo ci proponiamo di evidenziare alcuni dei principali vantaggi derivati dall'impiego delle colture cellulari negli studi di tossicità. Al tempo stesso ne vengono presentate le limitazioni e le strategie adottate per ampliarne le possibilità di impiego. Vengono anche riportati alcuni dei parametri più comunemente utilizzati per la valutazione degli effetti citotossici di una data sostanza. Sono quindi illustrati esempi dimostrativi dell'uso delle colture cellulari, e in particolare delle linee di neuroblastoma, per la valutazione degli effetti di agenti potenzialmente neurotossici (aflatossina B₁, proteina gp120 del capsido del virus dell'HIV e composti potenzialmente antituberculari quali la 5-aza-2'-deossicitidina e gli inibitori delle fosfodiesterasi) e per la delucidazione dei possibili meccanismi coinvolti.

INTRODUZIONE

L'introduzione di nuovi e più sensibili metodi analitici di indagine e l'integrazione di essi con le più recenti conoscenze dei processi biochimici e molecolari che presiedono al controllo delle funzioni cellulari, ha fatto sì che ai tradizionali approcci tossicologici si affiancassero dei metodi di indagine alternativi: i sistemi *in vitro*. Al momento ci sono pochi esempi di test tossicologici *in vitro* capaci di sostituire totalmente studi *in vivo* e dunque i modelli *in vitro* vanno considerati come mezzi di studio complementari. Le strategie correnti usate nei test tossicologici possono essere raggruppate in due distinte aree: (a) l'uso di animali da esperimento (*in vivo*) per la valutazione della tossicità generale (b) l'uso di cellule batteriche, cellule di roditori ed umane nei test *in vitro* di genotossicità e di tossicità acuta. Gli studi *in vivo* si pongono due obiettivi principali

- l'identificazione degli eventuali effetti tossici di sostanze in esame e dei tessuti bersaglio
- la definizione dei livelli di sostanza per i quali non risultano effetti dannosi (i mammiferi ed in particolare i roditori sono le specie animali più comunemente usate in questo tipo di esperimenti).

Un limite degli studi *in vivo* è rappresentato dalle

procedure spesso complesse, lunghe e costose, non adatte per un quotidiano lavoro di screening di sostanze potenzialmente tossiche. Questo approccio sperimentale inoltre non fornisce chiare informazioni circa la sensibilità dell'uomo alla sostanza in esame. Così ad esempio l'aflatossina B₁ (AFB₁), un potente epatotossico ed epatocarcinogeno (1) mostra una considerevole differenza nella curva dose-risposta tra diverse specie animali *in vivo*. Tale situazione rende necessaria l'estrapolazione dei dati dall'animale all'uomo. Nell'estrapolazione dei dati occorre tenere conto dei parametri tossicocinetici e tossicodinamici ed è necessaria la conoscenza dei meccanismi di tossicità della sostanza in esame per stabilire se la risposta osservata può aversi anche nell'uomo (2). Modelli *in vitro* hanno permesso di dimostrare, ad esempio, che la differente tossicità della AFB₁ è correlata con i processi di biotrasformazione (figura 1) e che la diversa suscettibilità osservata tra le varie specie animali (uomo incluso) dipende dall'equilibrio tra l'attivazione della micotossina mediata dal citocromo P-450 ed altre vie di detossificazione (3). I modelli *in vitro*, e le colture cellulari umane in particolare, offrono notevoli opportunità per lo sviluppo di test tossicologici in quanto rispondenti ad una necessità prioritaria della ricerca: l'impiego di modelli sperimentali semplificati

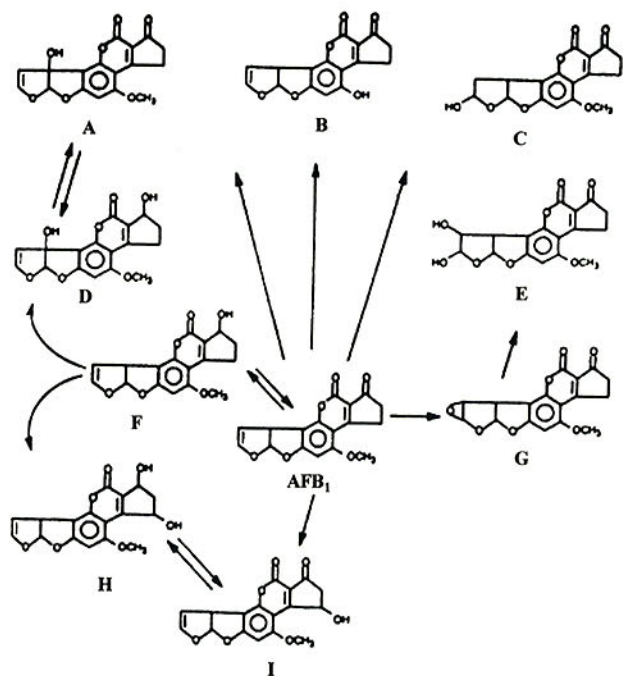


Figura 1

Metaboliti dell'Aflatoxina B₁ prodotti nel corso dei processi di biotrasformazione a livello epatico. A: aflatoxina M₁; B: aflatoxina P₁; C: aflatoxina B₁ emiacetale; D: aflatoxicolo M₁; E: Aflatoxina B₁-8,9-diidro-8,9-diolo; F: aflatoxicolo; G: aflatoxina B₁-8,9-epossido; H: aflatoxicolo H₁; I: aflatoxina Q₁

per indagare i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti. Uno degli aspetti più interessanti della sperimentazione con le colture cellulari è la possibilità di studiare effetti tossici sulla specie umana, semplificando i problemi inerenti l'estrapolazione dei dati tra diverse specie animali. Tale modello sperimentale risulta inoltre particolarmente vantaggioso nello studio dei meccanismi di tossicità, del metabolismo e della biotrasformazione di xenobiotici. A tal fine si privilegia l'uso di linee stabilizzate per la facilità di mantenimento, manipolazione e riproducibilità della popolazione cellulare. I saggi usati presentano caratteristiche di rapidità, semplicità di esecuzione, nonché costi ridotti; inoltre utilizzano indicatori sensibili, anche se non specifici, dello stato di tossicità e poco soggetti ad artefatti sperimentali. Ad esempio la valutazione della integrità della membrana è un parametro indicatore di eventuale citotossicità. L'aggiunta di molecole colorate o fluorescenti consente di valutare l'alterata permeabilità della membrana: membrane danneggiate permettono l'ingresso di molecole con caratteristiche chimico-fisiche tali da impedire l'attraversamento del doppio strato fosfolipidico quando questo sia integro (4). Il rilascio nel mezzo di incubazione di specifici costituenti cellulari quali enzimi come la lattico-deidrogenasi (LDH) o la malato-deidrogenasi risultante dal danneggiamento della membrana plasmatica, è anche un indicatore di sofferenza cellulare (5).

Il distacco delle cellule dal substrato, i cambiamenti morfologici e le variazioni dell'attività metabolica sono buoni indicatori di citotossicità, anche se i parametri più

comunemente usati sono la sopravvivenza cellulare, valutata con l'uso di coloranti vitali (6) o l'induzione di apoptosi, e l'inibizione della proliferazione cellulare, valutabile attraverso il conteggio diretto o indiretto delle cellule, quest'ultimo basato sulla quantificazione di componenti endogeni quali DNA e proteine o sulla valutazione di attività metaboliche (7,8,9). Le variazioni indotte da sostanze tossiche sulla respirazione e la glicolisi, inoltre possono essere rilevate dosando il consumo di ossigeno polarograficamente con l'elettrodo di Clark (10).

Culture che presentano inibizione della crescita mostrano anche alterazioni della progressione nel ciclo cellulare; queste alterazioni possono essere indicative del tipo di meccanismo che sta alla base dell'inibizione e quindi essere importanti per lo studio dei meccanismi di tossicità. La possibilità di controllare, sia parametri chimico-fisici (pH, temperatura, pressione osmotica, pressione di O₂ e di CO₂) sia le condizioni fisiologiche che possono essere mantenute relativamente costanti, nonché l'omogeneità della coltura (indotta, in colture primarie, dalla forte pressione selettiva che favorisce il tipo cellulare più resistente e maggiormente proliferante o da tecniche di clonaggio in linee stabili) agevola la riproducibilità di un esperimento con risposte statisticamente significative. L'omogeneità della coltura consente inoltre di saggiare direttamente l'effetto di un dato agente su uno specifico tipo cellulare, valutazione assai difficile da realizzare *in vivo*, soprattutto in sistemi complessi dal punto di vista strutturale e funzionale come ad esempio il sistema nervoso.

La semplicità di tale modello rispetto alla complessità di un organismo vivente (quindi la perdita dell'organizzazione tridimensionale, la mancanza di comunicazioni tra tipi cellulari diversi, l'assenza di fenomeni omeostatici), è d'altra parte il limite maggiore delle colture cellulari. Tutto ciò comporta che la loro applicazione in tossicologia sia limitata a fasi precoci della sperimentazione e principalmente alla chiarificazione dei meccanismi di tossicità in sistemi cellulari specifici. I tentativi di ovviare a queste limitazioni sono molti, ed un esempio è offerto dall'impiego delle co-culture. Le co-culture consentono di ricostruire *in vitro*, sia pure in forma semplificata, le interazioni complesse che si verificano *in vivo* tra cellule e tessuti diversi. Molti xenobiotici necessitano di bioattivazione per esplicare effetti tossici (11); la biotrasformazione è però un fenomeno complesso per l'intervento di molteplici fattori concomitanti quali la presenza di particolari isoenzimi, il pH, l'ossigenazione e/o la concentrazione di cofattori che possono influenzare la risposta funzionale della cellula, determinando la formazione di alcuni metaboliti e non di altri. La biotrasformazione di xenobiotici avviene prevalentemente negli epatociti e tale capacità biotrasformante può essere assente in altri tipi cellulari; inoltre alterazioni metaboliche quali la perdita di attività di enzimi della famiglia del citocromo p450 sono frequentemente riscontrabili in cellule in coltura (12,13). Pertanto, gli effetti tossici di una sostanza su cellule mancanti di enzimi bioattivi, potrebbero non essere rivelati; l'allestimento di appropriate co-culture permette di valutare l'influenza del metabolismo degli epato-

citi sulla tossicità della sostanza verso uno specifico tipo cellulare. La creazione di cellule geneticamente ingegnerizzate, consente di aumentare il grado di complessità di tali sistemi sperimentali, permettendo di chiarire vie metaboliche multiple (14). Comunque modelli *in vitro* non sono disponibili per tutti gli organi e tessuti. Inoltre i sistemi *in vitro* mancano delle complesse interazioni che si stabiliscono tra sistema immunitario, endocrino e nervoso, rendendo tali modelli inadatti per studi di tossicità sistemica. L'assenza dei normali meccanismi di assorbimento, distribuzione ed escrezione inoltre può rappresentare un ostacolo all'applicabilità dei risultati degli esperimenti *in vitro* alla situazione *in vivo*. La mancanza di informazioni relative alla biocinetica del composto può portare ad una errata interpretazione dei dati *in vitro*. Ciò può verificarsi se il composto in esame non è capace di raggiungere facilmente le cellule bersaglio nell'organismo integro. *in vitro* le cellule sarebbero esposte ad una concentrazione non realistica del composto in esame, portando ad una sovrastima del potere tossico della sostanza per quel dato tipo cellulare. Alternativamente certe sostanze possono accumularsi in specifici organi, tessuti o tipi cellulari nel qual caso il modello *in vitro* da luogo ad una sottostima degli effetti. L'applicabilità dei dati *in vitro* richiede allora un'integrazione dei dati relativi al meccanismo di azione del composto con dati relativi al suo comportamento biocinetico.

Va anche ricordato che i saggi vengono generalmente eseguiti su popolazioni cellulari in attiva proliferazione, condizione rara negli organismi adulti, nei quali le cellule in divisione sono limitate; ciò può portare ad errate valutazioni del potere citotossico di determinate sostanze, in quanto cellule post-mitotiche possono essere diversamente sensibili all'azione di composti tossici rispetto a cellule proliferanti. Tuttavia modificando opportunamente le condizioni di coltura, le cellule possono essere mantenute in condizioni di proliferazione o no e questo consente anche di valutare l'influenza dello stato fisiologico della cellula sulla risposta agli xenobiotici. I principali vantaggi

Tabella 1

Vantaggi e limiti delle colture cellulari in studi di tossicità

COLTURE CELLULARI

Vantaggi

Interpretazione dei meccanismi molecolari e cellulari della tossicità
Identificazione delle vie metaboliche della sostanza in esame
Rapido screening di sostanze potenzialmente tossiche anche su materiale umano
Sistemi semplificati ampiamente riproducibili
Possibilità di allestire il numero di repliche necessario per ottenere significatività statistica delle osservazioni
Limitazione dell'uso di animali da esperimento

Limiti

Sistemi semplificati rispetto ad un organismo pluricellulare
Condizioni diverse rispetto all'esposizione *in vivo*
Assenza di fenomeni omeostatici
Non tutti i meccanismi di tossicità possono essere chiariti in un unico sistema sperimentale
Caratteristiche delle cellule variabili con il tempo di coltura

ed i limiti delle colture cellulari per la valutazione della citotossicità sono riportati in Tabella 1.

Con questo contributo ci proponiamo di illustrare alcuni esempi, tratti dalla nostra esperienza, sull'uso delle colture cellulari in tossicologia ed in particolare di linee di neuroblastoma per valutare gli effetti su cellule neuronali 1) della aflatoxina B₁ 2) della proteina gp120 del capsido del virus HIV 3) di composti con possibile azione antiblastica.

AFLATOSSINA B₁

L'aflatoxina B₁ è una micotossina prodotta da due funghi (*Aspergillus flavus* ed *Aspergillus parasiticus*), contaminanti diffusi tra gli alimenti derivati da cereali provenienti principalmente da alcune aree del sud-est asiatico e del sud America. Il fegato è l'organo bersaglio per eccellenza della aflatoxina ed a carico di questo organo sono stati descritti effetti di cancerogenesi e tossicità acuta (15). Nei casi di avvelenamento da AFB₁ è stata inoltre osservata estesa compromissione cerebrale ed una sindrome infantile di encefalopatia (16), risultato non sorprendente se si considera che molte sostanze tossiche esercitano la loro azione attraverso interferenze dirette o indirette sul sistema nervoso (17). La sensibilità del sistema nervoso è correlata alla sua enorme complessità strutturale e funzionale, alle sue particolari attività metaboliche ed alla bassa capacità di rigenerazione. Poiché il sistema nervoso è costituito da un gran numero di cellule tutte altamente specializzate ed integrate tra loro in maniera complessa, il danno ad un piccolo numero di cellule in un'area localizzata può avere conseguenze profonde sulla sua funzionalità.

Diversi test di neurotossicità *in vivo* sono al momento disponibili; questi possono essere suddivisi nei seguenti gruppi: (I) osservazione clinica e test comportamentali e funzionali (18,19) (II) metodi elettrofisiologici (20) (III) metodi neuropatologici (21) (IV) metodi biochimici. Alcune limitazioni di questi test sono di seguito riportate:

- le procedure sperimentali stesse possono causare

alterazioni comportamentali

- le attrezzature per studi elettrofisiologici sono complesse e costose
- i metodi neuropatologici possono non essere sufficientemente sensibili.

L'enorme complessità del sistema nervoso e le difficoltà dell'approccio *in vivo* ad alcune problematiche giustifica in particolar modo l'impiego di modelli sperimentali *in vitro*. L'impiego di linee di neuroblastomi umani permette di chiarire, almeno parzialmente, i fenomeni di citotossicità sul sistema nervoso; l'impiego di queste colture permette ad esempio di stabilire se la neurotossicità della aflatoxina è legata ad un effetto diretto su neuroni o se alternativamente la tossina interagendo con altri bersagli compromette indirettamente la funzionalità neuronale.

Le linee neuronali SK-N-MC ed SK-N-SH (22,23) da noi utilizzate per lo studio della tossicità della Aflatoxina B1 sono fornite dalla ATCC (American Type Culture Collection) e sono state isolate da metastasi di neuroblastoma umano. La linea cellulare SK-N-MC è composta da piccole cellule con scarso citoplasma; il tempo di duplicazione nelle nostre condizioni di coltura è circa 28 ore e l'efficienza di piastramento è del 50% circa. L'attività dopamina β idrossilasi (l'enzima responsabile della conversione della dopamina a noradrenalina) è assente, mentre è espressa l'attività colina acetiltransferasi (l'enzima biosintetico dell'acetilcolina). La linea cellulare SK-N-SH, comprende due tipi cellulari distinti, piccole cellule spinose e grandi cellule epiteliodi. Tale linea è caratterizzata da elevata attività dopamina β idrossilasi. L'efficienza di piastramento per tale linea è intorno al 15% ed il tempo di duplicazione è di 48 ore. Entrambe le linee neuronali sono mantenute in terreno MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) con aggiunta di aminoacidi non essenziali, penicillina (50U/ml), streptomycina (50mg/L), piruvato di sodio (100mg/l) e siero bovino fetale (FCS) al 10%. Le cellule vengono mantenute in coltura in piastre da 100mm, a 37°C e in atmosfera al 5% di CO₂. Raggiunta la confluenza le cellule vengono staccate (con una soluzione di tripsina allo 0.05% e EDTA allo 0.02%), dissociate e piastrate ad una densità di circa 1.5'10⁶ cellule. Le cellule così propagate vengono utilizzate, a seconda delle esigenze sperimentali, allestendo colture in piastre o pozzetti di diverse dimensioni.

Inizialmente l'azione di AFB₁ è stata valutata su colture di cellule SK-N-MC ed SK-N-SH sfruttando il metodo colorimetrico di Mosmann (9). Il 3-4,5-dimetiltiazolo-2,5-difenil bromuro di tetrazonio (MTT) è un composto che viene metabolizzato dagli enzimi mitocondriali e che da luogo ad un precipitato colorato la cui entità è proporzionale alla quantità di substrato metabolizzato; l'intensità della colorazione, misurata in base all'assorbimento a 570 nm, è proporzionale al numero di cellule vitali. Colture di cellule trattate mostrano una diminuzione della percentuale di sopravvivenza (rispetto alle piastre di controllo) dipendente dalla concentrazione di AFB₁ e dal tempo di trattamento (23). Queste osservazioni dimostrano inoltre la maggior sensibilità della linea SK-N-MC all'aflatoxina. Considerando che la diminuzione del numero di cellule può dipendere sia dall'azione antiproliferativa che da un effetto

propriamente citotossico, al fine di caratterizzare in modo più preciso la risposta cellulare all'interazione con l'aflatoxina sono stati valutati alcuni parametri rivelatori sensibili di vitalità cellulare. La permeabilità della membrana plasmatica è un indicatore di citotossicità ed alterazioni della sua integrità sono state valutate in base al rilascio da parte della cellula di componenti citoplasmatici nel terreno di coltura. Nei nostri esperimenti il rilascio di LDH è stato misurato su colture trattate con 6mg/L di AFB₁ per 24 ore; l'attività è stata dosata direttamente nel mezzo di coltura prelevando a tempi diversi di trattamento aliquote di terreno. Il primo dosaggio è stato eseguito dopo 4 ore di esposizione ad AFB₁; nessuna variazione apprezzabile è stata osservata rispetto al controllo anche dopo 24 ore di esposizione. Un significativo incremento, rispetto alle colture di controllo, è invece rilevabile nel terreno prelevato da colture, nelle quali il trattamento con l'aflatoxina sia stato prolungato per 48 ore (Tabella 2).

Il rilascio di LDH nel terreno di coltura è ancora maggiore a 56 ore di esposizione, dimostrando che il danno cellulare causato dalla tossina è progressivo. L'integrità di membrana è stata anche valutata per mezzo del colorante fluorescente ioduro di propidio (un intercalante del DNA), su colture di cellule trattate con AFB₁ (6mg/L) per tempi compresi tra le 8 e le 72 ore. Il colorante è escluso dal nucleo delle cellule la cui membrana sia integra, pertanto la colorazione del nucleo è conseguenza di una alterazione della membrana plasmatica. Nella tabella 3 è riportata la percentuale delle cellule il cui nucleo è colorato con ioduro di propidio a tempi successivi dall'aggiunta di AFB₁.

L'analisi rivela, nelle colture trattate, un significativo aumento della percentuale di nuclei marcati rispetto alle cellule non trattate, analogamente a quanto osservato per il rilascio di LDH; questo incremento è evidente non prima delle 48 ore ed aumenta a tempi di trattamento più prolungati (72 ore). Il dosaggio dell'enzima LDH e l'incorporazione di coloranti nucleari fluorescenti dimostrano quindi l'effetto citotossico di AFB₁, la cui comparsa è evidente a 48 ore di trattamento. I dati relativi alla conta cellulare indicano invece una diminuzione della percentuale di sopravvivenza già a 24 ore di trattamento. L'insieme di questi dati suggerisce un effetto inibitorio della proliferazione cellulare, che precede l'effetto citotossico. La sintesi del

Tabella 2
Rilascio dell'enzima LDH durante il trattamento con AFB₁

Trattamento	Attività LDH (mU/piastra)	
	48 ore	56 ore
CTRL	56,4 ± 3,9	154,1 ± 9,2
DMSO	139,1 ± 9,1	278,7 ± 24
AFB ₁	213,5 ± 7,8	691,2 ± 38,9

Colture di SK-N-MC sono state esposte ad AFB₁ 6mg/L. A tempi diversi dall'inizio del trattamento, compresi tra le 4 e le 56 ore, sono stati effettuati prelievi del mezzo di coltura sul quale è stata dosata l'attività LDH. Il rilascio di LDH aumenta con il tempo di coltura, ma diviene significativamente maggiore rispetto alle colture di controllo, dopo 48 ore di esposizione. I dati riportati in tabella sono la media ± errore standard di tre determinazioni indipendenti

Tabella 3

Valutazione dell'integrità di membrana attraverso l'esclusione del colorante fluorescente ioduro di propidio

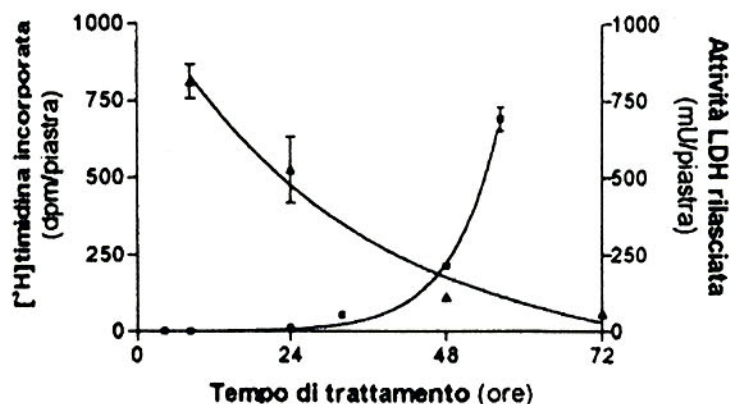
Tempo di trattamento (ore)	Trattamenti		Significatività (test t di Student)
	CTRL	AFB ₁	
8	2,5 ± 0,9	3,0 ± 0,6	P>0,05
12	2,8 ± 0,7	9,0 ± 0,7	P>0,05
24	2,2 ± 0,7	8,7 ± 3,8	P>0,05
48	2,0 ± 0,9	12,1 ± 0,9	P<0,05
72	0,9 ± 0,4	24,2 ± 2,8	P<0,05

Culture di cellule SK-N-MC sono state esposte a distanza di 24 ore dalla semina ad AFB₁ (6mg/L); a tempi successivi dall'inizio del trattamento, culture di controllo e trattate sono state incubate con ioduro di propidio e fotografate. Per ogni tempo di esposizione sono state allestite tre culture di controllo e tre trattate e di ogni coltura sono stati considerati 5 campi fotografici. Differenze significative nel numero di nuclei fluorescenti sono rivelabili a 48 ore di coltura quando il danno citotossico diviene manifesto. I valori riportati sono la media ± errore standard

DNA in colture trattate con AFB₁ può essere valutata mediante esperimenti di pulse and chase con radioisotopi. La capacità delle cellule proliferanti di incorporare timidina marcata radioattivamente ([³H] timidina) permette di valutare l'attività replicativa di una popolazione cellulare. La somministrazione di "pulse" di timidina della durata di 2 ore, a colture trattate con AFB₁ (6mg/L), mostra la diminuzione dell'incorporazione del nucleoside marcato già ad 8 ore dall'inizio del trattamento. A 24 ore dall'inizio del trattamento, l'incorporazione di timidina è inibita di circa l'80% e dopo 48 ore è praticamente assente. La rapida inibizione dell'incorporazione di [³H] timidina rispetto al manifestarsi di alterazioni della membrana dimostra che la riduzione dell'attività proliferativa si verifica più precocemente rispetto all'effetto propriamente citotossico (figura II).

PROTEINA GP120 DEL VIRUS HIV

Le colture cellulari possono essere utilizzate anche per

**Figura II**

Aumento del rilascio di LDH e diminuzione dell'incorporazione di [³H]timidina durante l'esposizione ad AFB₁

lo studio degli effetti tossici di proteine di origine virale. Un possibile esempio è rappresentato dallo studio della tossicità, a livello neuronale, della proteina gp120, un componente del capsido del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). E' interessante notare, infatti, che sebbene nei soggetti affetti da AIDS non sia stata osservata, nel sistema nervoso, una massiccia presenza dell'HIV né una sua attiva replicazione, sono state riportate alterazioni funzionali del sistema nervoso centrale e periferico correlate sia a infezioni opportunistiche che agli effetti di una diretta interazione del virus con componenti cellulari del sistema nervoso che si accompagnano in determinate aree cerebrali alla scomparsa anche del 30-40% dei neuroni (24,25,26). In particolare, utilizzando colture cellulari di neuroni, è stato osservato che la gp120 può indurre aumenti della concentrazione del calcio intracellulare sia agendo direttamente sui canali del calcio voltaggio dipendenti (27), sia determinando l'attivazione dei recettori del glutammato di tipo NMDA, permeabili al calcio, o infine agendo indirettamente via molecole neurotossiche prodotte da cellule microgliali o di origine macrofagica infettate dal virus (28,29).

Tra gli effetti citotossici della gp120 è stata inoltre riportata, *in vivo*, la diminuzione dell'utilizzazione del glucosio in seguito all'iniezione intratecale della proteina (30) e una incrementata suscettibilità all'ipoglicemia e al danno ischemico cerebrale in seguito alla sua somministrazione a ratti neonati (31). Queste osservazioni *in vivo* si correlano a quelle in coltura che dimostrano che la somministrazione di gp120 a colture di neuroni ippocampali di ratto induce neurotossicità, mobilizzazione del calcio intracellulare e una significativa diminuzione dei livelli di ATP, effetti che possono essere contrastati dal trattamento con elevate concentrazioni di glucosio nel terreno di coltura (32). Al fine di verificare un possibile effetto diretto della gp120 sul metabolismo neuronale, non mediato da altre cellule di origine gliale comunque presenti nelle colture primarie di ippocampo, è stata utilizzata una linea di neuroblastoma murino che fornisce un sistema sperimentale omogeneo nel quale è presente un'unica popolazione neuronale (33).

Un metodo particolarmente utile nello studio degli effetti indotti da molecole ad azione tossica su cellule in coltura è lo studio del consumo di ossigeno che può essere effettuato direttamente in colture di cellule in sospensione utilizzando elettrodi sensibili alla concentrazione di ossigeno (10). Il consumo di ossigeno in queste condizioni sperimentali può essere facilmente correlato alla sopravvivenza delle cellule in coltura o al loro stato metabolico anche in assenza di effetti che conducano alla morte delle cellule stesse. E' stato così osservato che il trattamento delle colture con gp120 induce una diminuzione del consumo di ossigeno di circa il 23% in assenza di effetti sulla sopravvivenza cellulare (33) che può essere valutata misurando il contenuto in DNA delle colture con

metodi fluorimetrici (34). L'effetto della gp120 può essere abolito dalla contemporanea somministrazione al terreno di coltura di un anticorpo in grado di complessarla rivelando così la specificità della sua azione tossica. Altre osservazioni sperimentali hanno rivelato che il diminuito consumo di ossigeno dovuto al trattamento con gp120 si correla ad una diminuita espressione di un'enzima chiave della glicolisi: l'enolasi specifica neuronale. L'analisi condotta per dot immunoblot, che permette di dosare la quantità di una proteina, ha rivelato, infatti, che nelle colture trattate con gp120 i livelli di enolasi erano ridotti di circa il 25% (33). L'insieme delle osservazioni suggerisce l'esistenza di una diretta interazione tra la proteina dell'involucro virale e le cellule neuronali che, determinando variazioni dei livelli di calcio intracellulare, si traduce in una diminuita espressione del gene dell'enolasi con conseguente compromissione del metabolismo energetico neuronale.

COMPOSTI CON POSSIBILE AZIONE ANTIBLASTICA

La 5-aza-2'-deossicitidina (5-aza-CdR) è un analogo della deossicitidina, che può essere utilizzata come substrato da tutti gli enzimi che intervengono nella sintesi dei deossinucleotidi trifosfato e nella loro successiva utilizzazione per la sintesi del DNA. La 5-aza-CdR può quindi sostituire la citidina nel DNA, ed interferire con il processo di metilazione del genoma (35). È stato dimostrato che, in diverse popolazioni cellulari, la sostituzione nel DNA di residui di citidina con azacitidina è in grado di promuovere il differenziamento cellulare e bloccare la proliferazione (36,37); queste osservazioni hanno suggerito la possibile utilizzazione di 5-aza-CdR nel trattamento delle leucemie (38). La possibilità di impiego della 5-aza-CdR nel trattamento di tali patologie tumorali ha fatto sì che la sperimentazione si interessasse anche all'utilizzo di questa mole-

cola nel trattamento di una forma di tumore solido maligno: il modello sperimentale è costituito da linee cellulari di neuroblastoma ottenute da prelievi di tumori umani.

La sopravvivenza delle cellule in presenza ed in assenza di 5-aza-CdR è stata determinata in esperimenti di piastramento sia ad alta densità che a densità clonale. In entrambe le condizioni sperimentali si è osservata una significativa inibizione della crescita cellulare in tutte le linee cellulari saggiate, pur osservando una notevole variabilità nel livello di inibizione della crescita tra le diverse linee, da un minimo di circa 30% a un massimo di circa 90% di inibizione (figura III). La variabilità nella risposta è sensibilmente ridotta negli esperimenti a densità clonale, in cui in genere le cellule sono più sensibili a condizioni avverse (39).

Lo stesso modello sperimentale è stato utilizzato per valutare l'azione antiproliferativa di un'altra classe di molecole, gli inibitori delle fosfodiesterasi (PDE) (40). È noto che i nucleotidi ciclici, cAMP e cGMP, svolgono un importante ruolo nella trasduzione del segnale. Variazione dei livelli di nucleotidi ciclici in relazione alla progressione nel ciclo cellulare sono state descritte e in particolare è stato dimostrato che un aumento di cAMP può causare l'arresto della proliferazione (41). I livelli cellulari di nucleotidi ciclici sono regolati oltre che dagli enzimi biosintetici (adenilato- e guanilato-ciclastasi), dalle PDE che li idrolizzano. Le PDE costituiscono un gruppo molto ampio e complesso di isoenzimi, che si differenziano per le loro caratteristiche biochimiche e per la loro distribuzione cellulare (42). Tranne che nel caso della isoforma espressa nella retina e coinvolta nella trasduzione del segnale luminoso, non è noto se ai diversi isoenzimi sia assegnata una specifica funzione. In relazione alle diversità cinetiche delle diverse isoforme sono stati prodotti inibitori selettivi, che possono essere utilizzati per inibire preferenzialmente l'attività di uno o l'altra delle isoforme, generalmente coesprese in

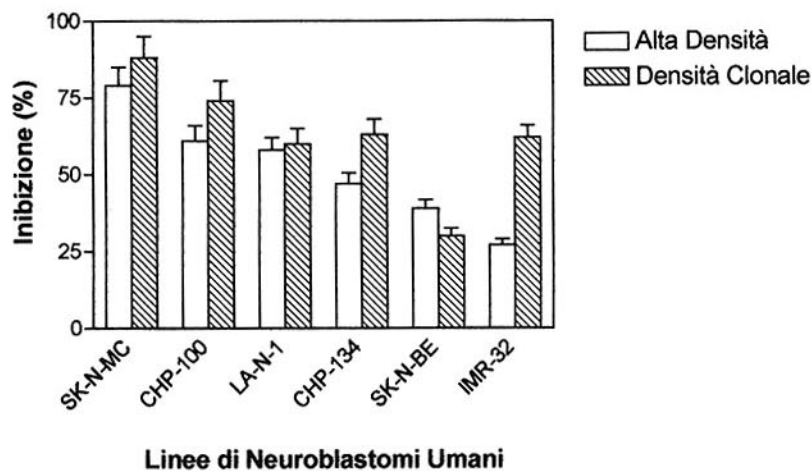


Figura III

Inibizione della sopravvivenza indotta dal trattamento con 5-aza-CdR 0,1 μ M su sei linee di neuroblastoma umano in esperimenti di piastramento sia ad alta densità che a densità clonale. In entrambi i casi le cellule erano trattate per 24 ore; negli esperimenti con piastramento ad alta densità venivano contate dopo 72 dal trattamento, in quelli con semina a densità clonale 8-10 giorni dopo, quando le colonie erano ben visibili. I valori mostrati rappresentano la percentuale rispetto a colture di controllo non trattate e sono la media \pm errore standard di almeno tre osservazioni indipendenti

una specifica popolazione cellulare. L'azione di due diversi inibitori, che selettivamente inibiscono la isoforma PDE4, che idrolizza il cAMP, e la isoforma PDE5, che idrolizza il cGMP, è stata valutata su una linea di neuroblastoma umano. Dai dati ottenuti è risultata una diversa risposta ai due inibitori, con una inibizione della formazione di colonie che va dal 20% per rolipram, inibitore della PDE4, al 90% per lo Zaprinas, inibitore delle PDE5 (40). Questa diversa sensibilità è stata messa in relazione con le isoforme specificamente espresse nelle cellule studiate.

BIBLIOGRAFIA

- McLeane M, Dutton MF. Cellular interaction and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmac Ther* 1995; 65: 163-192.
- Huggett AC, Shilter M, Roberfroid M, Antignac E, Koeman JK. Comparative methods of toxicity testing. *Fd Chem Toxic* 1996;34:183-192.
- Massey TE, Stewart RK, Daniels JM, Liu L. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208:213-227.
- Funa K, Dawson N, Jewett PB, Agren H, et al. Automated fluorescent analysis for drug-induced cytotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1986;70:1147-1151.
- Vassault A. U.V. method with piruvate and NADH. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods in Enzymatic Analysis*. Weinheim-Basel Verlag Chemie 1983;119-136.
- Rotman B, Papermaster BW. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluoregein esters, *Proc Natl Acad Sci USA* 1966;55:247-255.
- Mc Caffrey TA, Agarwal LA, Weksler BB. A rapid fluorimetric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation *in vitro*. *in vitro Cell Dev Biol* 1988; 24: 247-252.
- Bradford M. A rapid sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth* 1993;65:55-63.
- Clark LC, Wolf R, Granger D, Taylor Z. Continuous recording of blood oxygen tension by polarography. *J Appl Physiol* 1953;6:189-193.
- Miller EC, Miller J. Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophiles. In: Anders MW, editor. *Bioactivation of foreign compounds*. New York Academic Press 1985:3-29.
- Guezelian PS, Bissel DM, Meyer U.A. Drug metabolism in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Gastroenterol* 1977;72:1232-1239.
- Guillouzo A, Beaucane P, Gascoin MN, Bèguè JM, et al. Maintenance of cytochrome P-450 in cultured adult human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1985;34:2991-2995.
- Ferro M. Modelli cellulari per studi di metabolismo e tossicità epatica. In: Zucco F, Bianchi V, editor. *Culture cellulari in tossicologia*. Roma Lombardo Editore 1992;99-120.
- Ueno Y, Ueno I., Toxicology and biochemistry of micotoxins. In: Uruguchi K, Yamazaki M, editors. *Toxicology, Biochemistry and Pathology of Micotoxins* 1978;107-188.
- Chao T, Maxwell SM, Wong SY. An outbreak of aflatoxicosis and boric acid poisoning in Malaysia: a clinicopathological study. *J Phathol* 1991;164: 225-233.
- Ho IK, Hoskins B. Biochemical methods for neurotoxicological analysis of neuroregulators and cyclic nucleotides. In: Hayes AW editor. *Principles and Methods of Toxicology*. New York Raven Press 1982; 375-406.
- Tilson HA, Mitchell CL. Models for neurotoxicity. *Biochem Toxicol Rev* 1981;2:265-294.
- Tilson HA, Cabe PA. Strategy for the assessment of neurobehavioural consequences of environmental factors. *Environmental Health Perspectives* 1978;26:287-299.
- Johnson BL. Electrophysiological and Clinical Neurotoxicology. In: Spencer PS, Schaumburg HH, editors. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Baltimore Williams and Wilkins 1980;726-742.
- Spencer PS, Bischoff MC, Schaumburg HH. Neuropathological methods for the detection of neurotoxic disease. In: Spencer PS, Schaumburg HH, editors. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Baltimore Williams and Wilkins 1980; 743-757.
- Biedler JL., Helson L. Spengler B. Morphology and growth tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33:2643-2652.
- Bonsi P, Palmery M, Augusti-Tocco G. Aflatoxin B1 cytotoxicity in neurons in culture. *ATLA* 1996;24:533-540.
- Glass JD, Johnson RT. Human immunodeficiency virus and the brain. *Ann Rev Neurosci* 1996;19:1-26.
- Lipton SA. Ca²⁺, N-Methyl-D-Aspartate receptors, and AIDS-related neuronal injury. *Int Rev Neurobiol* 1994;36:1-27.
- Toggas SM, Masliah E, Rockenstein EM, Rall GF, et al. Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature* 1994;367:188-193.
- Dreyer EB, Kaiser PK, Offermann JT, Lipton SA. HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science* 1990;248:364-367.
- Giulian D, Vaca K, Noonan CA. Secretion of the neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 1990;250:1593-1596.
- Lipton SA. HIV coat protein gp120 induces soluble neurotoxins in culture medium. *Neurosci Res Commun* 1994;15:31-37.
- Kimes AS, London ED, Raymon L, Tabakoff B. Reduction of cerebral glucose utilization by envelope glycoprotein gp120. *Exp Neurol* 1991;112:224-228.
- Barks JDE, Sun R, Malinak C, Silverstein FS. Gp120, an HIV-1 protein, increases susceptibility to hypoglycemic and ischemic brain injury in perinatal rats. *Exp Neurol* 1995;132:123-133.
- Brooke SM, Howard SA, Sapolsky RM. Energy dependency of glucocorticoid exacerbation of gp120 neurotoxicity. *J Neurochem* 1998;71:1187-1193.
- Vignoli AL, Martini I, Haglid KG, Biagioni S et al. Neuronal glycolytic pathway impairment induced by HIV envelope glycoprotein gp120. *Mol Cell Biochem* 2000;215:73-80.
- West DC, Sattar A, Kumar S. A simplified in situ solubilization procedure for the determination of DNA and cell number in tissue cultured mammalian cells. *Anal Biochem* 1984;147:289-295.
- Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 1980;20:85-93.
- Pinto A, Attadia V, Fusco A. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* 1984;64:922-929.
- Bartolucci S, Estenez M, Longo A, Augusti-Tocco G, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine as inducer of differentiation and growth inhibition in mouse neuroblastoma cells. *Cell Differ* 1989;27:47-55.

38. Momparler RL, Rivard GE Gyger M. Clinical trials on 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia. *Pharmacol Ther* 1985;30:277-86.
39. Carpinelli P, Granata F, Augusti-Tocco G, Rossi M, Bartolucci S. Antiproliferative effects and DNA hypomethylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine in human neuroblastoma cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 1993;4:629-635.
40. Campagnolo L, Giorgi M, Augusti-Tocco G. Phosphodiesterase specific inhibitors controll cell growth of a human neuroepithelioma cell line. *Neuro-Oncology* 1997; 31: 123-27.
41. Friedman DL. Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. *Physiological Rev* 1976;56:652-708.
42. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterase: Functional implicational of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 1995;75: 725-748.