

-

Università degli Studi di Ferrara

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE, ENDOCRINOLOGICHE E
NEUROFISIOLOGICHE**

CICLO XXI

Coordinatore

Prof. Martini Alessandro

**ANALISI DELLA MORTE CELLULARE
INDOTTA DAL CISPLATINO E STUDIO DI
EVENTUALI SOSTANZE PROTETTIVE SU
MODELLI *IN VITRO***

Settore Scientifico Disciplinare MED/32

Dottorando

Dott.ssa Simon Edi

Tutore

Prof. Martini Alessandro

Anni 2006/2008

ABSTRACT

Il cisplatino (cis-DDP) è un chemioterapico ampiamente utilizzato nella cura di vari tipi di cancro. Sfortunatamente ha altresì molti effetti collaterali come l'ototossicità, può infatti causare danni in varie aree dell'orecchio interno. Il danno si esplica con la perdita uditiva alle alte frequenze, e con la morte, o mancata funzionalità, delle cellule cigliate dell'organo del Corti, dei neuroni del ganglio spirale e delle cellule della stria vascolare. Da studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* è stato dimostrato che il cis-DDP è in grado di indurre apoptosi alle cellule neurosensoriali dell'orecchio interno, effetto che sta alla base della capacità antineoplastica del cisplatino. Il meccanismo con il quale il cis-DDP causa ototossicità non è stato ancora chiarito, anche se è nota la sua capacità di formare legami con il DNA bloccando il ciclo cellulare. Il chemioterapico è inoltre in grado di indurre la formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) riducendo gli antiossidanti cellulari.

Da tempo sono studiate numerose sostanze da utilizzare come protezione del danno ototossico da cisplatino, in particolare si è posta molta l'attenzione nei confronti di molecole antiossidanti. L'estratto vegetale del *Ginkgo biloba* (EGb 761 o Ginkgoselect®) è conosciuto per le sue capacità di "spazzino" dei radicali liberi ed è stato testato come otoprotettore solo *in vivo* con esiti positivi. Uno degli scopi di questa tesi è stato quello di valutare la capacità protettiva del ginkgoselect su una linea cellulare derivante dall'orecchio interno di topo, le OC-k3. L'estratto vegetale si è dimostrato in grado di proteggere le cellule in maniera dose e tempo dipendente, preservandole dalla morte per apoptosi.

Nell'orecchio interno, lo ione calcio (Ca^{2+}) regola la funzionalità delle cellule cigliate e di quelle neuronali, essendo coinvolto sia nella trasduzione meccanica dell'impulso, sia nel rilascio dei neurotrasmettitori. Variazioni della sua concentrazione intracellulare determinano il destino della cellula, fungendo da secondo messaggero per l'attivazione di proteine coinvolte nel processo apoptotico. L'utilizzo di farmaci calcio-antagonisti è studiato come altro meccanismo per proteggere le cellule dal danno ototossico da cisplatino. La flunarizina è un farmaco bloccante del calcio, già utilizzato per la cura di patologie dell'orecchio interno, come le vertigini. Tuttavia ad oggi è poco studiato l'effetto protettivo del danno ototossico indotto da cisplatino. Le PC12 (cellule di feocromocitoma di ratto) sono una linea cellulare che se trattata con NGF differenzia in neuroni simpatetici, pertanto è da sempre utilizzata come modello di studio neuronale. In questa tesi è stata valutata la tossicità del cisplatino su queste cellule sia indifferenziate che differenziate, e la capacità protettiva della flunarizina, allo scopo di svolgere una indagine di base sul meccanismo d'azione di entrambe le sostanze somministrate singolarmente e in co-trattamento. La flunarizina è risultata un buon protettore nei confronti del danno tossico del cisplatino, in quanto è in grado di prevenire la morte cellulare per apoptosi agendo sull'espressione di alcune proteine coinvolte nella morte cellulare programmata (14-3-3 β , proteinchinasi C e GAPDH).

Questi dati risultano utili per svolgere in futuro indagini mirate su colture primarie dei neuroni del ganglio spirale.

Parole chiave: orecchio interno, OC-k3, PC12, cisplatino, *Ginkgo biloba*, flunarizina, apoptosi.

Cisplatin (cis-DDP) is a chemotherapy agent that is used as a treatment for several types of cancer. Unfortunately it could injure several areas of the cochlea, including outer hair cells in the Organ of Corti, the

spiral ganglion and the stria vascularis. Cis-DDP has been shown to induce auditory sensory cell apoptosis in vitro and in vivo. The mechanisms appear to involve the production of reactive oxygen species (ROS) and depletion of antioxidant enzymes which can trigger cell death.

Approaches to chemoprevention include the administration of antioxidants to protect against ROS. The Ginkgo biloba extract (EGb 761 o Ginkgoselect®) is known to have antioxidant proprieties with a free radicals scavenging effect, and protecting cells against apoptosis. It has been used for otoprotection study only in vivo model, with positive effects. One of the goal of this study was that to verify the protective effects of ginkgoselect on a mouse inner ear cell line (OC-k3). Our data showed that Ginkgo biloba extract protects against cisplatin-induced ototoxicity.

The calcium ion (Ca^{2+}) regulates hair and neuronal cells function in the inner ear. It's involved in the mechanical signal transduction, and release of neurotransmitters. Changes in its intracellular concentration determines the cell's fate. It's a second messenger that regulates the activation of proteins involved in apoptosis. Calcium channel antagonist drugs was studied as another mechanism to protect cells from cisplatin ototoxicity. Flunarizine is a calcium blocker drug, currently used to treat diseases of the inner ear, such as vertigo. There are very few data on flunarizine protective effect against cisplatin damages. The PC12 cell (rat pheochromocytoma cell line) within several days of NGF exposure, differentiate in sym-pathetic neurons, it's therefore always used as a neuronal model. In this thesis we have been evaluated the cisplatin toxicity on these cells, undifferentiated and differentiated, and the ability of flunarizina to protect cells, in order to conduct a basic survey focused on the mechanism of both drugs. In sum, flunarizina is a good protector against the cisplatin toxicity, it's able to preventing apoptosis by acting on expression of proteins involved in programmed cell death (14-3-3 β , protein

kinase C and GAPDH). Present results are of great interest to conduct further investigations on spiral ganglion primary neurons cultures.

Key words: inner ear, OC-k3, PC12, cisplatin, Ginkgo biloba, flunarizine, apoptosis.

INDICE

1 INTRODUZIONE	7
1.1 ANATOMIA DELL'ORECCHIO	8
1.1.1 La coclea	9
1.1.2 Trasduzione e trasmissione del suono	13
1.2 OTOTOSSICITA'	15
1.3 CISPLATINO	16
1.3.1 Storia del cisplatino	16
1.3.2 Struttura e chimica del cisplatino	16
1.3.3 Tossicità del cisplatino	19
1.4 L'APOPTOSI	23
1.4.1 Storia dell'apoptosi	23
1.4.2 Apoptosi vs necrosi	25
1.4.3 Fasi dell'apoptosi	27
1.4.4 Le vie del processo apoptotico	29
1.5 MOLECOLE COINVOLTE NEL PROCESSO APOPTOTICO	34
1.5.1 Le caspasi: le esecutrici centrali	34
1.5.2 La famiglia di Bcl-2	36
1.5.3 Altre proteine pro-apoptotiche e/o anti-apoptotiche	41
1.5.4 Il ruolo del calcio nel processo apoptotico	53
1.5.5 Il GAPDH	56
1.6 UTILIZZO DI COLTURE CELLULARI PER STUDI DI TOSSICITA' E PROTEZIONE	59
1.6.1 Le OCK-3	60
1.6.2 Le PC12	62
1.7 PROTEZIONE DAI DANNI OTOTOSSICI INDOTTI DAL CISPLATINO	65
1.7.1 Il Ginkgo biloba	66
1.7.2 La Flunarizina	68
1.8 SCOPO DELLA TESI	71
2 MATERIALI E METODI	73
2.1 COLTURE CELLULARI	73
2.1.1 Le OCK3	73
2.1.2 Le PC12 indifferenziate	73
2.1.3 Le PC12 differenziate	74
2.2 PROVE DI TOSSICITA' E DI PROTEZIONE	75
2.2.1 Esperimenti svolti sulle OCK3	75
2.2.2 Esperimenti eseguiti sulle PC12 indifferenziate	76
2.2.3 Esperimenti svolti sulle PC12 differenziate	77
2.4 STUDIO DELLA VITALITA' CELLULARE	78
2.4.1 Conte cellulari	78
2.4.2 Saggio colorimetrico	78
2.4.3 Citofluorimetro	79
2.6 STUDIO DELL'APOPTOSI	82
2.6.1 Analisi morfologia dell'apoptosi con annessina-V	82

2.6.2 Analisi morfologica con falloidina e dapi.....	83
2.6.3 Studio della fase tardiva con il DNA ladder.....	83
2.6.4 Valutazione dell'espressione proteica.....	85
2.7 INDAGINE STATISTICA.....	91
3 RISULTATI.....	92
3.1 ESPERIMENTI SVOLTI SULLE OC-k3.....	92
3.1.1 Studio delle tossicità del cisplatino.....	92
3.1.2 Analisi della tossicità del ginkgoselect.....	95
3.1.3 Studio della protezione del ginkgoselect.....	96
3.1.4 Studio del processo apoptotico.....	99
3.2 ESPERIMENTI SVOLTI SU PC12 INDIFFERENZIATE.....	103
3.2.1 Studio della tossicità del cisplatino	103
3.2.2 Analisi della tossicità della flunarizina.....	106
3.2.3 Saggio di protezione della flunarizina.....	107
3.2.4 Studio morfologico del processo apoptotico.....	108
3.2.5 Analisi dell'apoptosi con il DNA ladder.....	115
3.2.6 Studio dell'espressione di proteine coinvolte nel processo apoptotico.....	116
3.3 ESPERIMENTI SVOLTI SULLE PC12 DIFFERENZIATE.....	131
3.3.1 Studio della tossicità del cisplatino	131
3.3.2 Analisi della tossicità della flunarizina	133
4 DISCUSSIONE.....	137
4.1 TOSSICITÀ DEL CISPLATINO.....	138
4.2 PROTETTORI.....	142
4.2.1 Il Ginkgo biloba.....	142
4.2.2. La Flunarizina.....	144
4.3 FLUNARIZINA vs CISPLATINO: PROTEINE COINVOLTE.....	148
5 CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI.....	156
6 BIBLIOGRAFIA.....	159

1 INTRODUZIONE

Molti farmaci comunemente utilizzati per la cura di varie patologie sono efficaci nel debellare le malattie, ma sono altresì causa di effetti collaterali legati al tipo di principio attivo, alla posologia della somministrazione (quantità e durata) oltre che all'età e sensibilità del paziente. Nella cura del cancro in particolare si utilizzano chemioterapici integrati alla chirurgia e radioterapia. Gli antineoplastici ideali dovrebbero essere in grado di uccidere in modo selettivo solo le cellule tumorali. Solo pochi farmaci attualmente disponibili sono in grado di seguire questo criterio, la maggior parte provoca danni a tessuti e organi fra i quali i più colpiti sono il fegato e i reni; alcuni causano alterazioni nell'orecchio interno portando nei casi più gravi alla perdita dell'udito. Frequentemente, certi effetti collaterali sono reversibili una volta interrotta la terapia, oppure riducibili con l'utilizzo di protettori; altre volte invece, diventa estremamente difficile il ripristino delle condizioni iniziali soprattutto per organi che non hanno capacità rigenerativa (Katzung, 2006).

L'orecchio interno non riesce a rigenerare le cellule deputate alla funzione uditiva, è pertanto di interesse la ricerca di sostanze in grado di prevenire la perdita di tali cellule e preservare l'udito del paziente.

1.1 ANATOMIA DELL'ORECCHIO

L'apparato uditivo è composto da tre parti, l'orecchio esterno (OE), l'orecchio medio (OM) e l'orecchio interno (OI). L'OE è formato dal padiglione auricolare e dal condotto uditivo esterno, è collegato all'OM dalla membrana timpanica (MT). L'OM è costituito dalla MT, la tuba d'Eustachio e una cavità (cassa del timpano) dove alloggiavano i 3 ossicini costituenti la catena ossiculare (martello, incudine e staffa), e si connette con l'orecchio interno attraverso le finestre rotonda e ovale. OE e OM fungono da apparato di conduzione e amplificazione del suono proveniente dall'ambiente esterno verso l'OI. Quest'ultimo contiene la parte sensoriale dell'udito (la coclea) e l'apparato vestibolare deputato al controllo dell'equilibrio, con i rispettivi nervi acustico e vestibolare (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998) (Fig. 1).

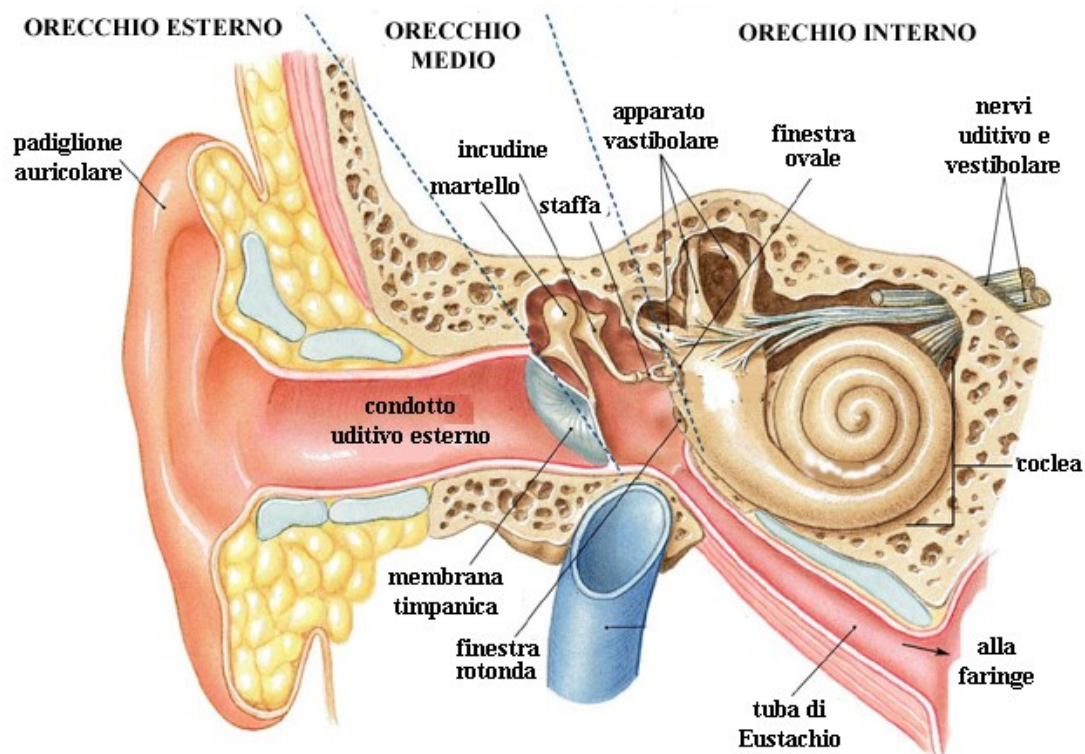


Figura 1: schema dell'apparato uditivo.

1.1.1 La coclea

La coclea è una struttura a chiocciola che nell'uomo compie 2 giri e $\frac{3}{4}$ attorno ad una massa conica di tessuto fibroso, il modiolo. È formata da un canale o labirinto osseo e da uno membranoso (interno al primo) che delimita una cavità detta condotto cocleare (Fig. 2A). Visto in sezione trasversale il condotto cocleare è divisibile in tre parti, la scala vestibolare (SV), la scala media (SM) e la scala timpanica (ST) (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998) (Fig. 2).

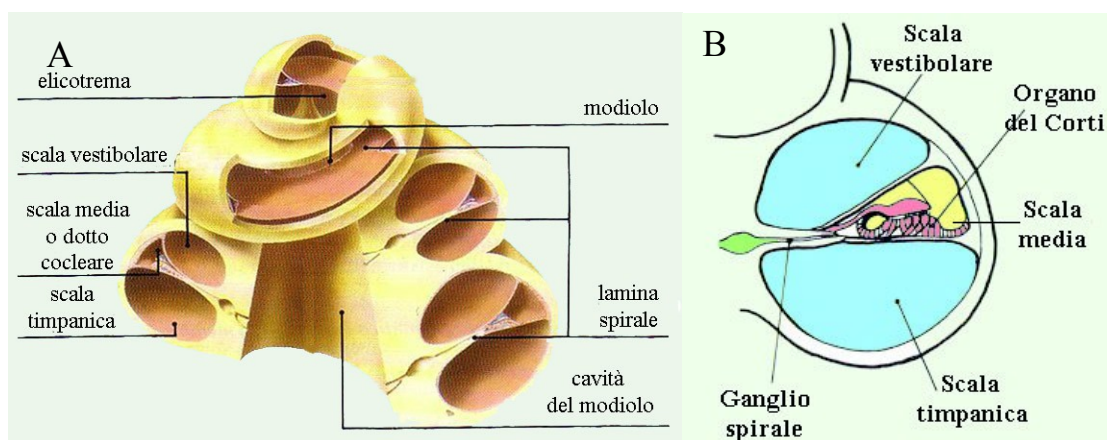


Figura 2: struttura della coclea. A: sezione trasversale della coclea; B: dettaglio del dotto cocleare.

La scala vestibolare e quella timpanica comunicano all'apice della coclea tramite un'apertura chiamata elicotrema (Fig 2A). La SV comunica con l'orecchio medio attraverso la finestra ovale mentre la ST lo fa tramite la finestra rotonda; in entrambe le scale scorre la perilinfa, pertanto il suono viene trasmesso dall'aria (presente nell'OM) al liquido (presente nell'OI) sotto forma di onde pressorie (Rossi, 1997).

La scala media in sezione trasversale si presenta come un triangolo, è il vero e proprio labirinto membranoso detta anche dotto cocleare, al suo interno scorre l'endolinfa e si trova l'organo del Corti (ODC) (Fig. 2B). Il dotto cocleare è delimitato lateralmente dal legamento spirale, un tessuto connettivo che lo fissa alla parte esterna del labirinto osseo della coclea, questo legamento è rivestito da tessuto altamente vascolarizzato, la stria

vascolare. Superiormente la scala media è limitata dalla membrana del Raissner che unisce il legamento spirale con la lamina spirale ossea (porzione che sporge dal modiolo), mentre in basso è presente la membrana basilare sulla quale poggia l'ODC (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998) (Fig. 3).

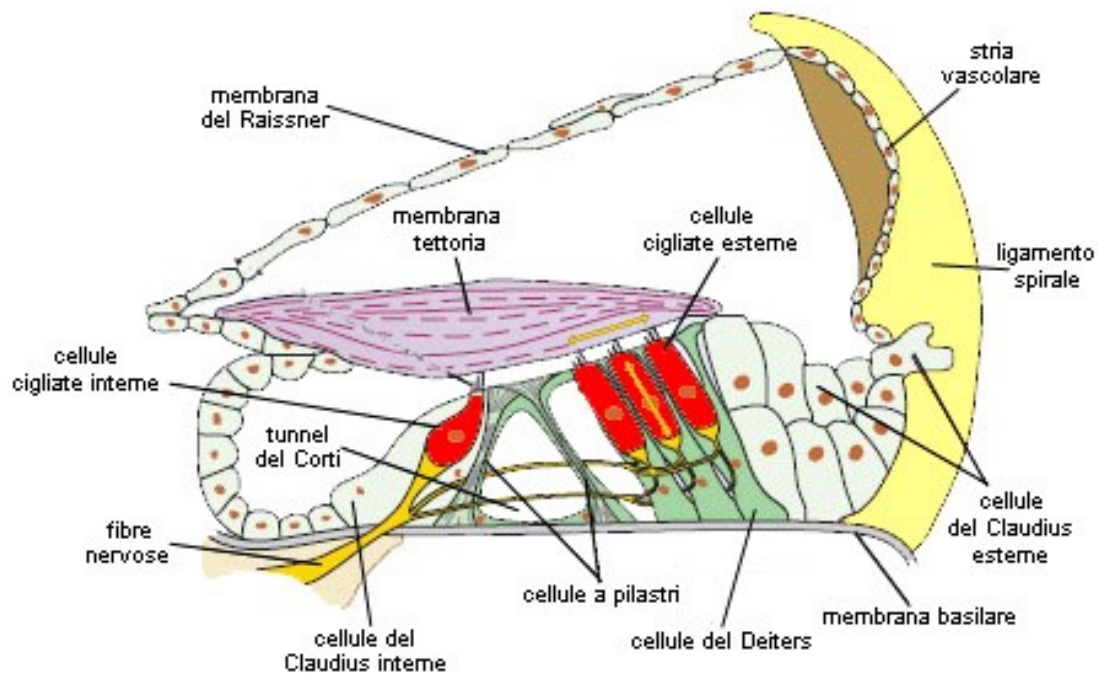


Figura 3: struttura del dotto cocleare.

All'interno del modiolo, lungo il margine di attacco della lamina spirale scorre il canale del Rosenthal nel quale si trova un lungo ganglio nervoso, il ganglio spirale (GS) (Trevisi & Ricci, 1998) (Fig.2).

1.1.1.1 L'organo del Corti

Questo organo è formato da cellule di sostegno e cellule sensoriali, chiamate cellule cigliate (CC), per via della presenza di stereociglia (i fonorecettori) all'apice cellulare. Cellule ricche di citoscheletro (i pilastri) delimitano uno spazio triangolare, il tunnel del Corti, che percorre longitudinalmente il dotto cocleare. Lateralmente al tunnel si trovano le cellule cigliate distribuite in file longitudinali, e si dividono in una fila di cellule cigliate interne (CCI) e tre file di cellule cigliate esterne (CCE) (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998) (Figg. 3, 4). Le CCI e le CCE differiscono sia in numero sia per la loro forma sia per la struttura delle stereociglia, le prime sono circa 3.400, hanno una forma a fiasco con stereociglia allineate e disposte in 2 file, le esterne invece sono circa 30.000, hanno una forma cilindrica e le 3 file di stereociglia formano una "W" (Grandori & Martini, 1995; Trevisi & Ricci, 1998).

Sull'ODC poggia la membrana tectoria che prende contatto con le stereociglia delle cellule sensoriali esterne (Figg. 3, 4). Le cellule cigliate sono connesse al sistema nervoso centrale (SNC) da una via afferente che porta lo stimolo acustico alla corteccia uditiva e da fibre efferenti che trasmettono gli stimoli dal SNC all'organo del Corti (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998) (Fig. 4).

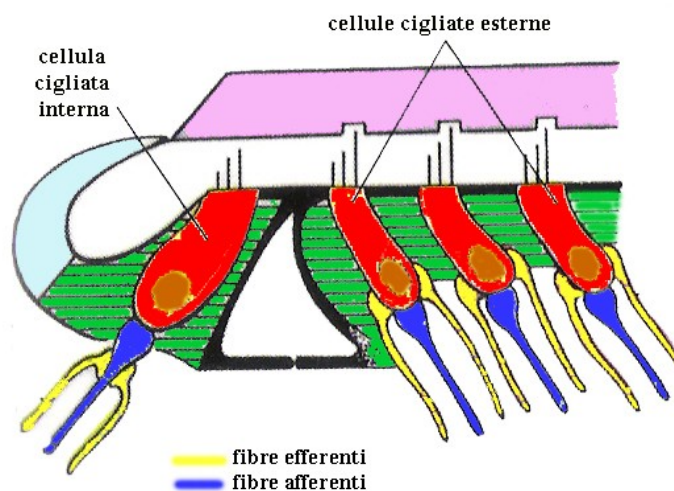


Figura 4: dettaglio delle connessioni nervose delle cellule cigliate.

1.1.1.2 Il ganglio spirale

Nel modiolo è contenuto il ganglio spirale che è costituito dai corpi cellulari dei singoli neuroni afferenti alla coclea, essi formano il nervo uditivo il quale assieme al nervo vestibolare costituisce il nervo acustico (VIII paio di nervi cranici) (Trevisi & Ricci, 1998).

Il ganglio spirale è simile ai gangli dei nervi cerebrospinali. Dal punto di vista ultrastrutturale, nel GS ci sono 3 popolazioni di cellule (Spoendlin 1972, 1973), le prevalenti sono quelle di tipo I (90-95%) sono le più grandi, sono neuroni bipolari con nucleo rotondeggiante e nucleolo ben evidente e il citoplasma è ricco di reticolo endoplasmatico rugoso, hanno terminazioni nervose ricoperte di mielina che perdono quando arrivano in prossimità dell'ODC (Fig. 5A). Le cellule di tipo II sono solo il 5% e sono più piccole, singole o in gruppi lungo tutta la spirale della coclea, sembrano essere neuroni pseudo-unipolari e sono considerate amieliniche con il citoplasma ricco di neurofilamenti (Fig. 5B). Il tipo III (1%) è simile al tipo I ma manca di guaina mielinica (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998)

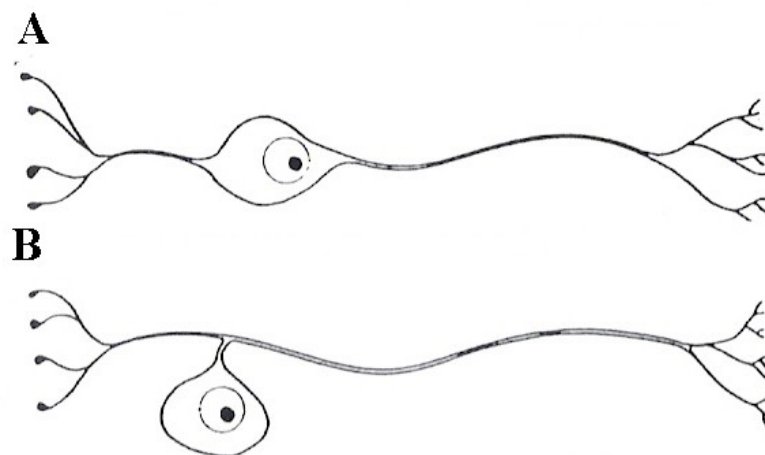


Figura 5: esempi di due tipologie di neuroni. A) neurone bipolare; B) neurone pseudo-unipolare o a T.

Le fibre nervose provenienti dal ganglio spirale prendono contatto con le cellule cigliate dell'ODC in quantità maggiore verso le CCI (95%) il

restante 5% innerva le CCE (Spoendlin, 1972). Le cellule cigliate interne vengono innervate da più fibre nervose e ciò è importante per discriminare i suoni, mentre nel caso delle cellule cigliate esterne una fibra nervosa può innervare più cellule, questo permette di avere una migliore sensibilità nel segnale. Le fibre dei neuroni di tipo I innervano principalmente le CCI, le cellule di tipo II invece innervano le CCE, infine, le cellule di tipo III collegano fra loro diverse cellule cigliate interne (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998).

I neuroni del ganglio spirale sono la prima tappa della via acustica afferente che termina a livello della corteccia uditiva, nel telencefalo.

1.1.2 Trasduzione e trasmissione del suono

Le vibrazioni provenienti dall'orecchio medio vengono trasmesse attraverso la staffa sulla finestra ovale causando onde di pressione con frequenza correlata ai suoni che le hanno generate. Tali onde si propagano lungo la scala vestibolare raggiungendo l'apice cocleare e passando nella scala timpanica per poi dissiparsi quando raggiungono la finestra rotonda, durante questo "percorso" mettono in movimento il dotto cocleare inducendo la membrana basale e l'ODC a vibrare (Grandori & Martini, 1995; Rossi, 1997; Trevisi & Ricci, 1998; Campbell 2004) (Fig. 6).

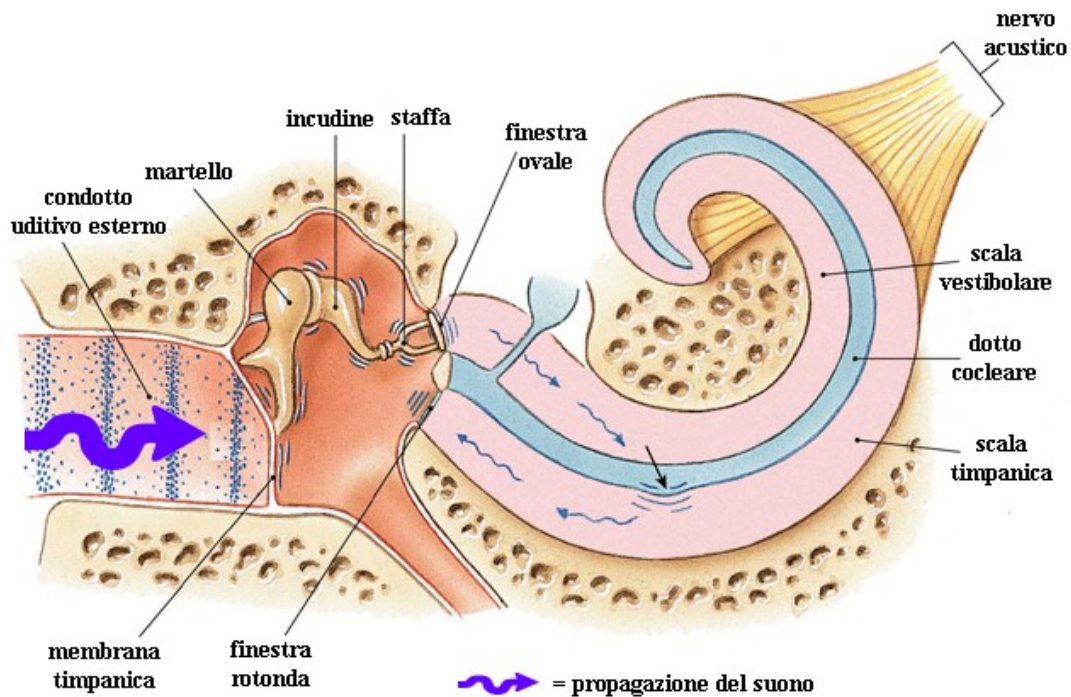


Figura 6: trasmissione del suono dall'orecchio esterno a quello interno.

La membrana tectoria sotto questo tipo di stimolo viene spinta in basso e in alto causando il movimento delle stereociglia delle CC, questo comporta la deformazione della loro membrana plasmatica con aumento della permeabilità cellulare agli ioni sodio. Il risultato è la depolarizzazione della cellula cigliata con il conseguente rilascio di neurotrasmettitori che giungono alle fibre nervose del ganglio spirale che le innervano; in questo modo un impulso meccanico viene trasdotto in uno elettrico, un potenziale d'azione che viene inviato alla corteccia uditiva (Grandori & Martini, 1995; Campbell, 2004).

Quindi l'onda pressoria condotta dall'aria viene trasformata in impulsi nervosi percepiti dal telencefalo come suoni. Un'alterazione morfologica e/o funzionale presente ad uno o più livelli della catena di trasmissione del suono comporta una compromissione della capacità uditiva.

1.2 OTOTOSSICITA'

Una diminuzione unilaterale o bilaterale della capacità uditiva viene definita ipoacusia. Quando ci sono delle alterazioni a livello dell'orecchio esterno e medio si parla di ipoacusie di trasmissione o di conduzione, sono invece chiamate in generale neurosensoriali quando interessano l'orecchio interno (ipoacusie cocleari) e deficit nelle vie nervose e nei centri cocleari (ipoacusie retro-cocleari). Le ultime due tipologie vengono considerate ipoacusie recettive la terza invece è detta di percezione. Si possono, inoltre, avere delle ipoacusie miste (Rossi, 1997; Ekbom, 2003).

Si conoscono, inoltre, fenomeni chiamati acufeni (o tinnito) che riguardano una eccessiva stimolazione di un punto qualsiasi della via acustica dal Corti sino alle aree corticali e sono delle percezioni sonore in assenza di stimolazioni dei recettori cocleari (rumori di fondo) (Rossi, 1997).

La perdita uditiva lieve o grave, colpisce il 10% della popolazione mondiale e può essere dovuta a fattori congeniti e ereditari che riguardano principalmente l'età infantile, o a fattori acquisiti che interessano anche l'adulto, tra quest'ultimi rientrano le forme tossiche endogene e esogene. L'ipoacusia tossica esogena è dovuta a fattori che generano stress, come il rumore, le infezioni e principalmente i farmaci ototossici. Quest'ultimi sono sostanze che provocano la perdita o disfunzione delle cellule uditive (cellule cigliate e neuroni). Il danno ototossico può essere reversibile o irreversibile. Tra le sostanze ototossiche ci sono gli antibiotici i diuretici, gli antimalarici, gli antinfluenzali, gli antineoplastici e altre sostanze come la nicotina, il cloroformio etc. (Rossi, 1997).

Tra gli antineoplastici che causano ototossicità si colloca il cisplatino.

1.3 CISPLATINO

1.3.1 Storia del cisplatino

Il cisplatino (cis-Diamminedichloroplatinum (II) o cis-DDP) è un citostatico complesso metallo inorganico che fu sintetizzato da Perone nel 1845. Solo dopo 120 anni fu scoperta casualmente la sua attività biologica, quando studiando la crescita batterica in un campo elettrico, si vide che gli elettrodi al platino inibivano la divisione di *Escherichia coli* e ne inducevano una crescita in forma filamentosa. Fu così scoperta una nuova classe di agenti antitumorali in grado di inibire la divisione ma non la crescita cellulare (Rosenbreg et al. 1965; Katzung 2006).

Esso è il primo antitumorale al platino introdotto in clinica, i primi risultati furono pubblicati nel 1972 da Rossof et al.. Il cis-DDP è una delle più potenti droghe chemioterapeutiche; è molto attivo in un ampio spettro di neoplasie, tra cui i tumori polmonari, dell'esofago e dello stomaco, del capo e del collo, del tratto genitourinario (testicolo, ovaio e vescica) (Eastman, 1991; Rosenberg 1999; Katzung 2006).

Spesso è utilizzato a basse dosi somministrate più volte al giorno, assieme alla radioterapia con la quale dà effetti sinergici e con limitati effetti collaterali sistemici (Marcu et al., 2003).

1.3.2 Struttura e chimica del cisplatino

Il cisplatino è una piccola molecola costituita da uno ione platino centrale circondato da quattro ligandi, due gruppi amminici e due cloridrici; quando questi ultimi sono disposti in posizione *cis* la molecola ha attività chemoterapica, se sono in posizione *trans* non ha attività (Goodsell, 2006) (Fig. 7A).

L'uptake cellulare del cisplatino non è ancora ben conosciuto, ma sembra che questa molecola entri nella cellula, in parte, passivamente per diffusione attraverso i canali transmembrana e in parte per diffusione facilitata attraverso un sistema di trasporto di membrana non ancora identificato (Gately & Howell, 1990). A seguito della diffusione entro la cellula, i due atomi di cloro presenti nel cis-DDP vengono sostituiti da due molecole di acqua, generando una molecola carica positivamente e molto reattiva, detta complesso monoidrato (Fig. 7B). Quest'ultima è la forma citotossica, in quanto è in grado di interagire con siti nucleofili come proteine cellulari, la membrana fosfolipidica, i microfilamenti del citoscheletro, molecole contenenti gruppi tiolici, l'RNA e il DNA cellulare e mitocondriale (Andrews & Howell, 1990) (Fig. 7C).

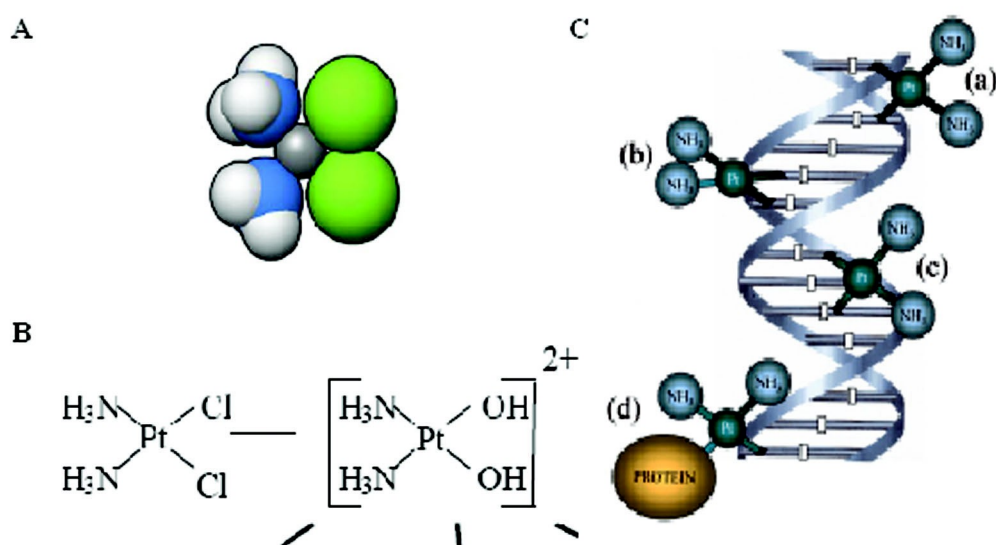


Figura 7: A- conformazione *cis* del cisplatino(preso da Goodsell, 2006); B- Struttura del cisplatino prima e dopo l'entrata nella cellula (presa da Mandic, 2003); C- legami crociati tra cisplatino reattivo e filamento di DNA: (a) legami inter elica, (b) legami 1,2-intraelica, (c) legami 1, 3-intraelica, (d) legami tra proteina e DNA (Gonzales et al., 2001).

Il meccanismo d'azione del cisplatino non è ancora ben conosciuto. Viene considerato un analogo degli agenti alchilanti, sembra che solo l'1% del cis-DDP intracellulare sia in grado di interagire con il DNA nucleare creando dei legami crociati tra ed entro il filamento di DNA e tra proteine e

DNA. La maggior parte dei complessi intra-filamento si formano tra guanine adiacenti e tra guanine e adenine attigue e rappresentano rispettivamente il 65% e il 25% del totale dei complessi formati. (Eastmann, 1991; Perez, 1998) (Fig. 7C).

Il legame del cis-DDP con il DNA nucleare causa una inibizione della sintesi dell'acido nucleico dose dipendente. Una delle prime forme di citotossicità del cisplatino avvengono a carico dei mitocondri, ma anche verso proteine con funzioni cruciali per la cellula a causa dell'elevata affinità del chemioterapico per i gruppi sulfidrilici (Ekborn, 2003).

In passato si pensava che la citotossità del cisplatino fosse il risultato dell'inibizione della sintesi del DNA. Tuttavia è documentato che le cellule muoiono a concentrazioni che non inibiscono la sintesi dell'acido nucleico (Sorenson & Eastman, 1988a, 1988b). Per capire quali sono gli eventi iniziali che legano la morte cellulare con i danni al DNA indotti dal cisplatino molti studi si sono focalizzati sull'analisi e sulla caratterizzazione di proteine in grado di riconoscere e riparare questi danni. Si conoscono quattro famiglie di proteine:

- 1- NER (nucleotide excision repair protein);
- 2- MMR (mismatch repair protein);
- 3- DNA-PK (DNA-dependent protein kinase);
- 4- HMG (high-mobility group proteins) (Gonzales et al., 2001).

I complessi del cisplatino sono riparati soprattutto dai NER. L'MMR è un sistema di riparazione post-replicazione che riconosce e corregge le sequenze errate nel filamento fratello lasciando i complessi del cisplatino intatti. Questo è un ciclo inutile di riparazione che può generare delle rotture del DNA e attivare il processo di morte cellulare (Perez, 1998; Gonzales et al., 2001).

DNA-PK è un altro sistema di riparazione che serve per eliminare le parti di doppia elica interrotte, questo sistema interagisce con le lesioni al DNA indotte dal cisplatino (Turchi & Henkels, 1996). Le DNA-PK

vengono attivate dal legame della loro subunità Ku con il DNA, acquisendo così la capacità di autofosforilarsi e di fosforilare altre proteine. In presenza di complessi cisplatino-DNA la subunità Ku fatica a traslocare sulla doppia elica e viene di conseguenza ridotta la attività chinasi della proteina (Henkel & Turchi, 1997).

Le HMG sono una famiglia di piccole proteine multifunzionali associate alla cromatina non istonica, esse intervengono nella regolazione genica e nel mantenimento della struttura cromatinica. Le proteine HMG-box hanno un'alta affinità per il DNA modificato dal cisplatino ma si legano anche ai complessi formati tra queste due molecole proteggendoli dagli enzimi che riparano il DNA (Zamble & Lippard, 1999; Gonzales et al., 2001).

Anche se si considera come tappa critica dell'azione tossica del cisplatino l'attacco al DNA genomico anche altri target intervengono nel processo citotossico del farmaco, infatti, danneggia il DNA mitocondriale, agisce sulla fosfatidilserina di membrana, distrugge il citoscheletro e altera la polimerizzazione dell'actina (Jamieson & Lippard, 1999).

Tutto ciò può portare alla morte cellulare per apoptosi o necrosi. L'induzione dell'apoptosi sta alla base della sua funzione di antitumorale (Dive & Hickman, 1991).

1.3.3 Tossicità del cisplatino

La somministrazione clinica del cisplatino comporta effetti collaterali, quali la nefrotossicità, la neurotossicità e la resistenza di cellule tumorali. Difetti nel programma apoptotico sono i fattori che contribuiscono maggiormente alla resistenza al cisplatino, insieme con l'incremento dell'espulsione del farmaco e una diminuzione del suo flusso in entrata, l'aumento del glutathione cellulare e dei livelli di metallothioneina, l'aumento della riparazione del DNA e l'espressione degli oncogeni (Perez, 1998).

Ad alte dosi causa nefrotossicità, tossicità a livello gastrointestinale, neurotossicità e ototossicità (Ekborn, 2003).

Per quanto riguarda la nefrotossicità si manifesta con un aumento della creatina e una diminuzione della clearance renale (Hutchison et al., 1988). Studi morfologici mostrano che i principali effetti sono a carico dei tubi prossimali (Dobyan et al., 1980). Ad oggi l'effetto nefrotossico viene prevenuto preidratando il paziente e stimolando la diuresi infondendo soluzione salina associata a mannitolo e ad altri diuretici (Finley et al., 1985; Katzung, 2006).

A livello gastrointestinale invece, il trattamento con cisplatino provoca come effetti collaterali, nausea, vomito e anoressia che sono anch'essi limitabili (Ekborn, 2003).

La neurotossicità è dose dipendente, si manifesta come una neuropatia sensoriale distale la quale può essere dolorosa ed è irreversibile (Alberts & Nobel, 1995; Quathoff & Hartung, 2002).

L'ototossicità del cisplatino è dose e frequenza dipendente, si manifesta con una perdita uditiva inizialmente alle alte frequenze per poi progredire verso quelle della parola ed è spesso accompagnata da tinnito transiente o permanente (Rademaker-Lakhai et al., 2006). Esiste un'ampia variabilità individuale le cui cause sono sconosciute, probabilmente imputabili a differenze nella farmacocinetica, a fattori genetici, allo stato metabolico del paziente (Laurell & Jungnelius, 1990), all'età, alla combinazione con altri farmaci e ad un debole udito già preesistente (Reddel et al., 1982; Bokemeyer et al., 1998).

Nell'orecchio interno il cisplatino ha principalmente effetto sull'organo del Corti, sulle cellule del ganglio spirale e sulla stria vascolare causando alterazioni morfologiche e morte cellulare. Nell'uomo è stata infatti evidenziata la degenerazione delle CCE del giro basale della coclea in alcuni casi estesa alle CCI e ai neuroni ad esse associati (Rybak et al., 1995, 1999; Evans & Halliwell, 1999; Alam et al., 2000; Huang et al.,

2000; Watanabe et al., 2001). A livello sperimentale la tossicità del cisplatino risulta maggiore a carico delle cellule cigliate esterne (Laurell & Bagger-Sjoberg, 1991, Kopke et al., 1997; Liu et al., 1998; Van Ruijven et al., 2005) e della stria vascolare (Meech et al., 1998), ma sono state anche riscontrate alterazioni istologiche a livello del ganglio spirale nel quale si può riscontrare una significativa diminuzione del numero di cellule (Rybak et al., 1995; Cardinaal et al., 2000) oltre che la perdita della guaina mielinica nelle cellule di tipo I (Van Ruijven et al., 2005).

L'effetto tossico del cisplatino si esplica attraverso diverse vie, una di queste implica la formazione di addotti con il DNA che bloccano la progressione del ciclo cellulare (Huang et al., 1995; Kharbanda et al., 1995; Jordan & Carmo-Fonseca, 2000; Kartalou & Essigmann, 2001). Nell'altra via il cisplatino interagisce con i tessuti cocleari generando radicali liberi (ROS; reactive oxygen species) (Clerici et al. 1995, 1996; Kopke et al., 1997; Evans & Halliwell, 1999; Rybak et al., 1999; Feghali et al., 2001; Teranishi et al., 2001) come l'anione superossido (Dehene et al., 2001; Banfi et al., 2004) e l'ossido nitrico (NO) che si forma ad opera dell'enzima NOS (Nitric oxide synthase) esso è legato alla coclea sia dal punto di vista fisiologico sia patologico (Feesenden & Schct, 1998; Hess et al., 1999; Nakagawa et al., 1999). Vari autori riportano, infatti, che in animali riceventi dosi ototossiche di cis-DDP si aveva una riduzione del glutatione e degli antiossidanti cellulari (superossido dismutasi, catalasi, e glutatione perossidasi e reduttasi) con un incremento dei livelli della malonildialdeide, un indicatore della perossidazione lipidica (Ravi et al., 1995; Rybak et al., 2000; Sha et al., 2001). La diminuzione degli enzimi antiossidanti a livello della coclea può risultare dal legame del cisplatino con i gruppi sulfidrilici degli enzimi, dalla riduzione del rame e del selenio che sono essenziali per il funzionamento della superossidodismutasi e della glutatione perossidasi (DeWoskin & Riviere, 1992), oppure dall'aumento dei ROS e dei perossidi organici i quali inattivano gli enzimi antiossidanti (Pigeolet et al., 1990), ed

infine, dalla diminuzione del glutatione e del cofattore NADPH che sono essenziali per l'attività della glutation perossidasi e reduttasi (Somani et al., 2001). L'inibizione degli enzimi antiossidanti dovuta al cisplatino permette la produzione di ROS e di perossidi lipidici entro la coclea; questo processo causa un aumento nel flusso del calcio in entrata nelle cellule con induzione del processo apoptotico sia sulle cellule cigliate sia sui neuroni (Clerici et al., 1995; Bowers et al., 2002).

Entrambe le vie di azione del cisplatino portano alla morte cellulare per apoptosi o per necrosi, ma i meccanismi molecolari con i quali il chemioterapico altera la funzionalità delle cellule uditive non è stato ancora completamente chiarito.

1.4 L'APOPTOSI

L'apoptosi o morte cellulare programmata è un processo elementare della vita che, assieme alla proliferazione e al differenziamento mantiene l'omeostasi di tessuti ed organi; ha quindi un ruolo importante nello sviluppo di organismi pluricellulari, nella regolazione e nel mantenimento della popolazione cellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Leist & Jaattela, 2001). Il fatto che invertebrati e mammiferi mostrino molte omologie su molecole del pathway apoptotico e sulle vie di trasduzione del segnale sta ad indicare che è un meccanismo fortemente conservato. Poichè è documentato che anche durante le prime fasi della filogenesi, non solo le piante e gli animali, ma anche gli organismi eucarioti e procarioti hanno la tendenza a subire una morte cellulare per apoptosi, risulta che questo processo non è esclusivo degli organismi pluricellulari (Lewis, 2000).

Alterazioni a carico di questo sofisticato processo spostano l'equilibrio cellulare verso un'instabilità che talvolta risulta dannosa per l'organismo, manifestandosi sotto forma di malattie degenerative o tumorali (Bohm & Schild, 2003).

1.4.1 Storia dell'apoptosi

Nel 1842 Vogt studiando la metamorfosi di un anfibio documentò per la prima volta che le cellule muoiono durante lo sviluppo dell'individuo, in seguito questo fenomeno venne dimostrato in molti tessuti, sia di invertebrati, che di vertebrati (Gluecksmann, 1951; Lockshin & Zakeri, 2001). Il termine morte cellulare programmata (MCP) fu coniato nel 1965 (Lockishin & Williams, 1965a, 1965b) ed è stato usato per descrivere un tipo di morte durante la quale le cellule seguono una sequenza di tappe geneticamente controllate che le portano ad autodistruggersi. La MCP

durante lo sviluppo si verifica in punti e tempi ben stabiliti. Inoltre, è stato scoperto che è il meccanismo più importante per rimuovere cellule indesiderate o potenzialmente pericolose, come cellule infettate da virus, linfociti autoreattivi e cellule tumorali (Lockshin & Zakeri, 2001). Le ricerche recenti sono una elaborazione degli studi di Kerr (1971), il quale indusse l'atrofia nel fegato di un ratto legando la branca maggiore della vena porta. Egli causò così la morte delle cellule epatiche con peculiari cambiamenti morfologici come il decremento del volume cellulare, il ripiegamento della membrana citoplasmatica, la condensazione della cromatina vicino alla membrana nucleare e la segregazione cellulare con la formazione di numerose vescicole contenenti gli organelli cellulari intatti. Questo fenomeno venne inizialmente identificato come una necrosi anomala (anche detta *shrinking necrosis*). Un anno dopo questo nome è stato modificato in apoptosi (dal greco $\alpha\pi\omicron$ = cadere giù) in analogia con la caduta delle foglie degli alberi e dei petali dei fiori, ciò enfatizza il fatto che la morte di materiale vivente è un processo necessario e integrante del ciclo vitale di tutti gli organismi (Kerr, 1972).

Un'altra importante tappa nella ricerca sull'apoptosi è stata la scoperta della frammentazione del DNA nelle cellule indotte alla morte. Questi frammenti, fatti migrare su un gel mostravano la tipica struttura a scala (conosciuta come *ladder*), suggerendo che i frammenti stessi fossero dei multipli dei nucleosomi, il legame tra questo schema a scala e l'apoptosi fu descritto da Wyllie et al. (1980).

Il terzo evento importante nella ricerca sull'apoptosi fu la sua descrizione nel nematode *Caenorhabditis elegans*. Ellis & Horvitz (1986) dimostrarono come durante lo sviluppo embrionale di questo animale 131 cellule su 1090 venivano eliminate. In seguito è diventato evidente che l'apoptosi era controllata da speciali geni che furono chiamati *ced-3* e *ced-4* che nei mammiferi sono omologhi delle caspasi e dell'Apaf-1 (Ellis et al., 1991).

1.4.2 Apoptosi vs necrosi

La morte cellulare programmata è codificata a livello genetico e si distingue dalla necrosi o morte cellulare accidentale sia dal punto di vista morfologico, sia biochimico (Vermes et al, 2000).

La necrosi avviene in seguito a gravi ed irreversibili danni patologici come l'ipossia, l'ipertermia, l'infezione virale o l'esposizione a vari agenti tossici (Israels, 1999). Questi eventi portano inizialmente a modificazioni reversibili quali il rigonfiamento delle cellule con formazione di piccole vescicole. Se il processo continua, si arriva ad un punto di non ritorno caratterizzato dalla dilatazione dei mitocondri e dalla formazione di grosse vescicole. A questo segue la lisi degli organelli cellulari e del nucleo, dovuta alla perdita dell'integrità delle membrane stesse. In conseguenza si ha il rilascio del contenuto degli organuli nel cistosol (ATP, proteasi e lisozimi) e la degradazione aspecifica del DNA. Infine, si ha lo scoppio della cellula con rilascio del materiale citoplasmatico nel mezzo extracellulare richiamando elementi della risposta infiammatoria (Majno & Joris, 1995) (Fig. 8).

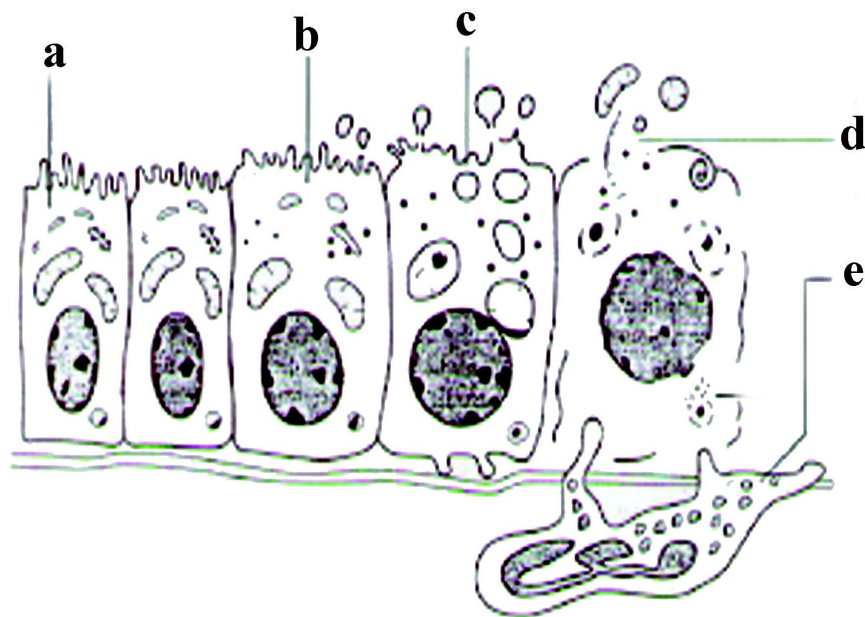


Figura 8: Fasi del processo necrotico. a) cellula normale; b) modificazioni reversibili; c) punto di non ritorno; d) rottura della membrana cellulare e dispersione degli organuli; e) attivazione della risposta infiammatoria (Wyllie, 1992)

Al contrario, durante l'apoptosi, si ha una serie di eventi ordinati e stereotipati. Nella fase iniziale, dal punto di vista morfologico, la cellula subisce una riduzione del volume citosolico con restringimento cellulare (shrinkage) dovuto alla distruzione del citoscheletro. Ciò comporta la perdita delle specializzazioni di membrana con conseguente distacco dalle cellule vicine. In seguito, mentre gli organelli cellulari rimangono intatti si nota una condensazione della cromatina (picnosi). Nelle fasi più tardive a livello nucleare avviene la disgregazione del nucleolo, e la frammentazione della cromatina in porzioni di 180-200 paia di basi o multipli. La lunghezza di tali frammenti corrisponde a quella dei tratti di DNA internucleosomale (Granville et al., 1998) ed il taglio è operato da endonucleasi attive solo

durante il processo apoptotico (Enari et al., 1998). Infine, i granuli di cromatina degradata si spostano verso la periferia del nucleo raggiungendo la membrana plasmatica, dove vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (blebbing). Queste bolle si staccano dal corpo cellulare costituendo i così detti corpi apoptotici che vengono fagocitati dai macrofagi o da cellule vicine, senza che ci sia una reazione infiammatoria (Wyllie, 1992; Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003) (Fig. 9).

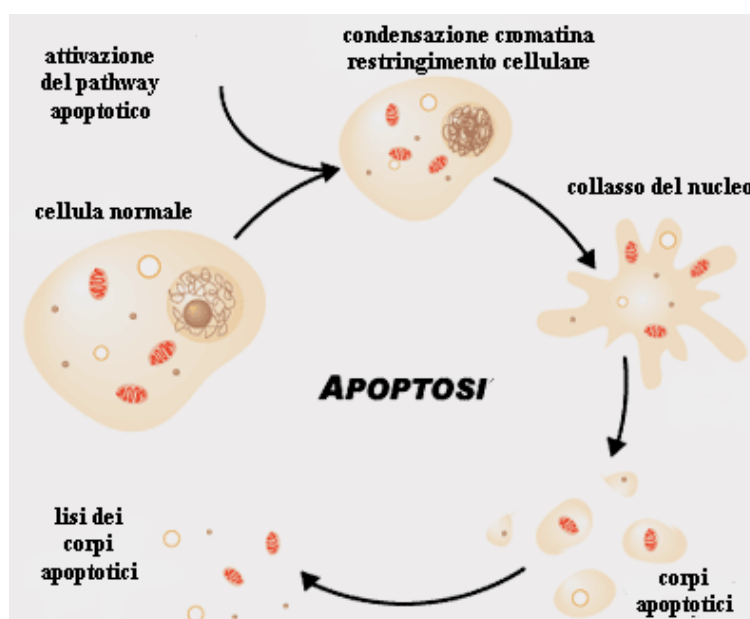


Figura 9: fasi del processo apoptotico.

Il processo apoptotico richiede alti livelli di ATP, a seconda di quanto ATP è presente all'interno della cellula è possibile sapere se essa morirà per apoptosi o per necrosi (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997).

1.4.3 Fasi dell'apoptosi

Il processo apoptotico viene diviso in quattro fasi, una iniziatrice o di induzione, una esecutrice, una di riconoscimento e una di fagocitosi. La prima fase ha inizio con l'arrivo di segnali, interni o esterni alla cellula (mediati da recettori), altri fisici o genotossici (l'espressione di oncogeni

etc.). In questa fase i segnali sono individuati dalla cellula che, come risposta, attiva vie multiple di trasduzione e amplificazione del segnale. Prende così inizio la fase esecutrice, durante la quale la macchina apoptotica agisce secondo diversi obiettivi portando a morte la cellula mediante l'attivazione di diverse proteine tra le quali le caspasi (cysteinyl aspartate prtoteinases). Infine, intervengono dei sistemi di riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006).

Nelle prime fasi dell'apoptosi la membrana cellulare subisce delle alterazioni funzionali; la fosfatidilserina (phosphatidylserine= PS) che normalmente è localizzata sulla superficie interna della membrana citoplasmatica, viene esposta all'esterno (meccanismo a "Fip-Flop") e può essere riconosciuta con l'utilizzo dell'annessina-V in grado di legarla (Fig. 10). La PS è uno dei vari segnali che, le cellule adiacenti o altre con capacità fagocitaria, riconoscono per distruggere i corpi apoptotici. La perdita di ioni K^+ attraverso la membrana citoplasmatica insieme al taglio enzimatico del citoscheletro causa lo shrinkage cellulare. Simultaneamente aumenta l'entrata di ioni Ca^{2+} , importanti per l'attivazione degli enzimi della catena apoptotica (Böhm & Schild, 2003).

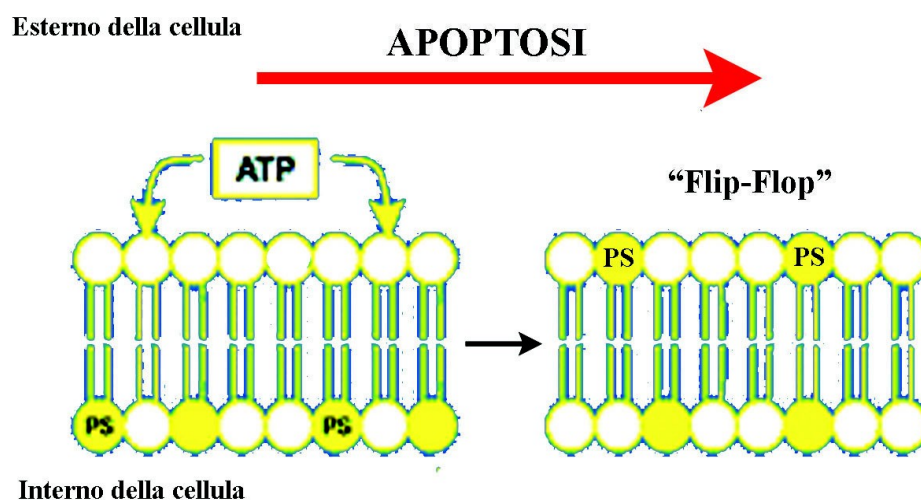


Figura 10: fasi iniziali dell'apoptosi; meccanismo a "Flip-Flop" con esposizione della fosfatidilserina (PS) sulla membrana citoplasmatica.

1.4.4 Le vie del processo apoptotico

Nella fase iniziatrice l'apoptosi è regolata da due tipi di vie, una estrinseca (recettoriale) e una intrinseca (mitocondriale e del reticolo endoplasmatico) che sono reversibili e regolabili fino a quando non convergono alla attivazione delle caspasi, le principali esecutrici della morte cellulare (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006).

1.4.4.1 Via estrinseca o recettoriale

La via estrinseca comporta l'attivazione di specifici recettori di membrana chiamati recettori di morte, appartenenti alla famiglia del Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) tra i quali si conoscono il Fas (anche conosciuto come CD95 o Apo-1), il TNF-R1, TRAIL-R1 e il TRAIL-R2 e infine il DR3, il DR4, il DR5, e il DR6 (Sartorius et al., 2001; Ashkenazi, 2002). Questi recettori possiedono diversi domini, quello extracellulare ricco di cisteina, quello di transmembrana e infine, quello citoplasmatico, quest'ultimo chiamato dominio di morte (Death Domain= DD). Al legame specifico recettore-ligando segue la trimerizzazione del recettore ed il reclutamento di proteine adattatrici (Fas-Associated Death Domain= FADD, TNFR-Associated Death Domain=TRADD e FLICE-Associated Huge protein= FLASH) presenti nel citoplasma e che si vanno a legare ai DD formando un complesso chiamato DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003). Attraverso dei domini effettori di morte (Death Effector Domai = DED) presenti sulle molecole adattatrici, il DISC può legare proteine, come la procaspasi-8 per interazione omotipica DED-DED. La procaspasi-8 viene attivata proteoliticamente a caspasi-8 la quale è così in grado di attivare altre proteine tra le quali la casapasi-3; quest'ultima è indispensabile per l'esecuzione della morte cellulare programmata (Krammer, 2000; Böhm & Schild, 2003; Gewies, 2003; Mandic, 2003) (Fig. 11).

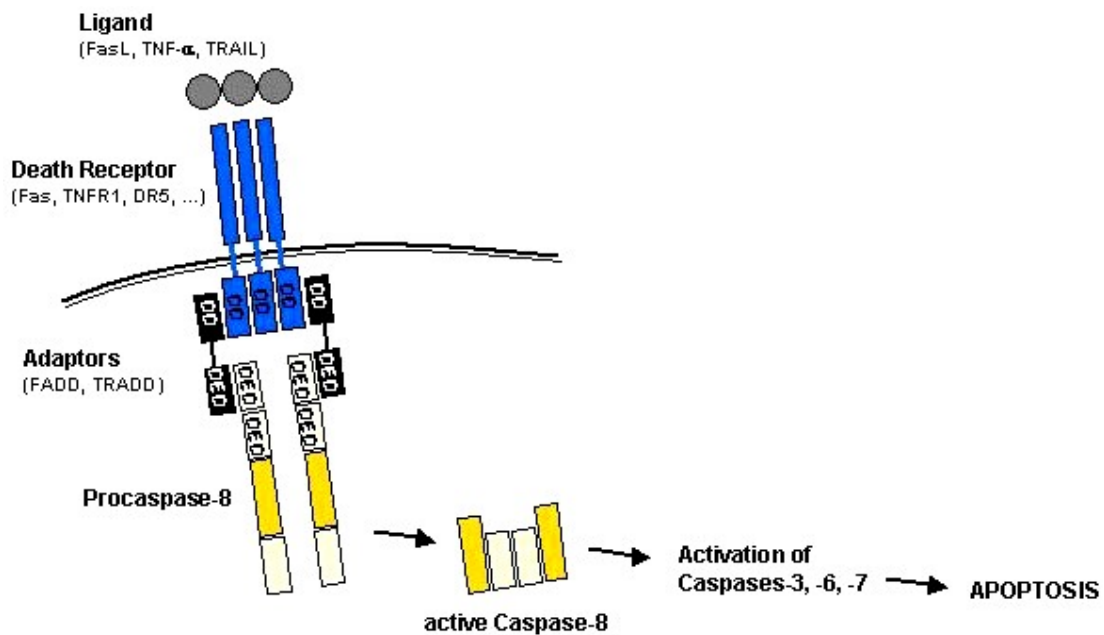


Figura 11: via estrinseca dell'apoptosi. DD= Death domain, DED= Death Effector Domain. (Gewies, 2003).

1.4.4.2 Via intrinseca mitocondriale

La via mitocondriale integra e propaga dei segnali di morte, alcuni dei quali si originano entro la cellula in conseguenza al danneggiamento del DNA, ad uno stress ossidativo, allo shock termico, all'eliminazione di fattori di crescita, alla somministrazione di un chemioterapico o di radiazioni UV. Anche la via estrinseca può convergere su quella mitocondriale, indicando una interazione tra i due pathway (Kaufmann & Earnshaw, 2000; Wang, 2001; Mandic, 2003; Fumarola & Guidotti, 2004).

Il mitocondrio è un organello con due compartimenti ben definiti; la matrice è circondata da due membrane, una interna (MI) e una esterna (ME) che delimitano uno spazio intermembrana contenente varie molecole come l'ATP sintetasi e le componenti della catena respiratoria. In condizioni fisiologiche queste molecole creano un potenziale di transmembrana (PT) o gradiente elettrochimico. Molte delle condizioni che inducono apoptosi intervengono sul mitocondrio alterando il PT oltre che la permeabilità delle membrane dell'organulo in questione. Ciò comporta l'induzione di una cascata di eventi, con formazione di pori sulla ME e

conseguente rilascio nel citoplasma di proteine pro-apoptotiche presenti nello spazio tra le due membrane mitocondriali (Bernardi et al., 1999; Loeffler & Kroemer, 2000), oltre che al rilascio di ioni Ca^{2+} dalla matrice mitocondriale (Zoratti & Szabo, 1995). Tra le proteine rilasciate vi è anche il citocromo-C, che normalmente è localizzato sulla porzione esterna della MI e nello spazio intermembrana, ha una importante funzione nella catena di trasporto degli elettroni durante la produzione di ATP. Una volta rilasciato nel citoplasma diverse molecole di citocromo-C si legano a sette molecole di Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor); assieme ai dATPs reclutano altrettante molecole di procaspasi-9 tramite dei domini CARD (caspasi recruiting domain) e formano un complesso chiamato apoptosoma, il quale attiva la caspasi-9 (Li et al. 1997; Zou et al., 1997), quest'ultima è a sua volta in grado di attivare la caspasi-3 e indurre di conseguenza la morte cellulare (Slee et al., 1999; Van de Craen et al., 1999; Böhm & Schild, 2003) (Fig. 12).

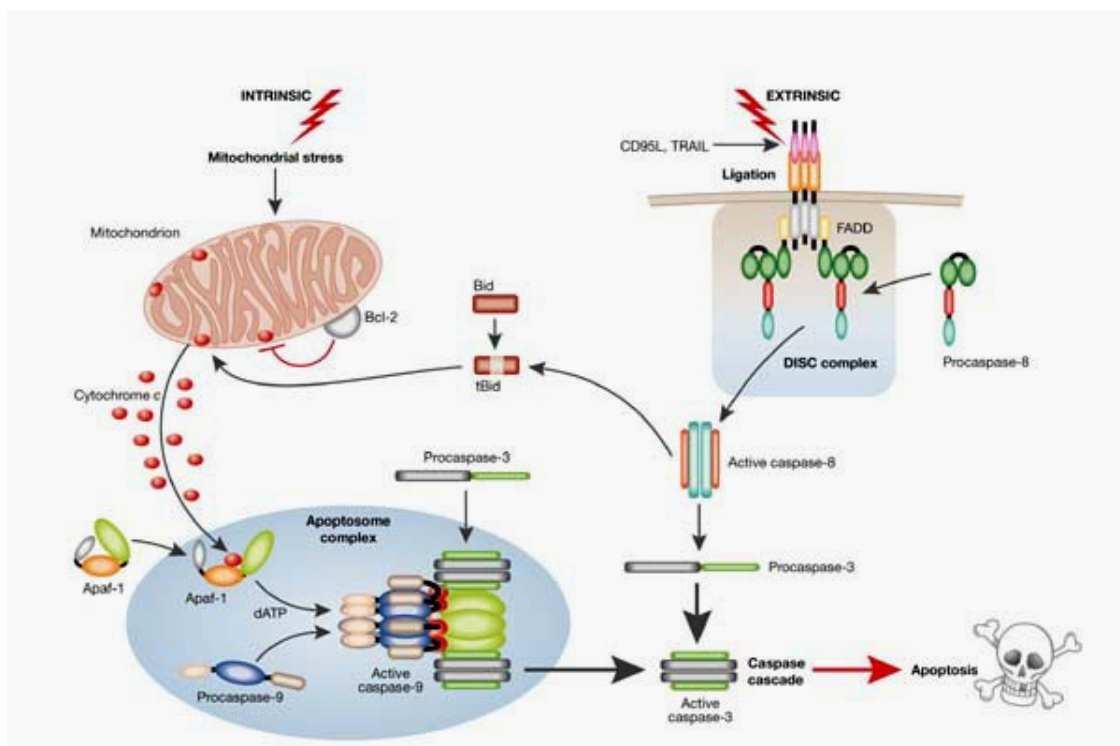


Figura 12: via intrinseca ed estrinseca del processo apoptotico. (Apoptosis and disease: a life or death decision. EMBO Rep. 2004 Jul; 5(7): 674-678. Epub 2004 Jun 25).

Assieme al citocromo-C il mitocondrio rilascia altre proteine che sono in grado di mediare l'apoptosi, alcune in maniera caspasi indipendente. Tra queste si conoscono il fattore AIF (apoptosis-inducing factor) il quale trasloca al nucleo e media la frammentazione del DNA in frammenti di 50kb (Susin et al., 1999) e la endonucleasi G la cui funzione non è ancora stata chiarita (Li et al., 2001a). Tra caspasi-dipendenti si conoscono la proteina Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspasi/ direct IAP-binding protein with low pI) che previene l'inattivazione della caspasi-3, della -7 e della -9 operata dalle IAP (proteine inibenti l'apoptosi) inibendo le IAP stesse (Verhagen et al., 2000; Srinvasula et al., 2001; Breckenridge & Xue 2004) ed infine la serin proteasi HtrA2/Omi che ha un meccanismo simile alla Smac/DIABLO (Suzuky et al., 2001; Verhagen et al., 2002).

Per quanto riguarda la convergenza delle due vie è documentato che la caspasi-8 attivata nella via estrinseca media il taglio di una proteina citosolica, il Bid. Dopo il taglio, Bid trasloca sulla membrana mitocondriale favorendo il rilascio del citocromo C e la successiva attivazione della caspasi e quindi la via intrinseca (Luo et al., 1998 Gross et al. 1999) (Fig. 12).

1.4.4.3 Via intrinseca del reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico (RE) è anch'esso coinvolto nel processo apoptotico. Normalmente il RE regola la sintesi, il ripiegamento e il trasporto delle proteine, inoltre, interviene nella regolazione dei livelli di calcio citoplasmatico e nella risposta cellulare a vari tipi di stress. Pertanto agenti o sostanze che vanno ad alterare queste sue caratteristiche funzionali scatenano una serie di processi enzimatici che portano il RE ad uno stato di stress che, se prolungato nel tempo, può condurre alla morte della cellula per attivazione della caspasi-12 (Nakagawa et al. 2000; Rao et al., 2002). Quest'ultima, è presente nel RE sottoforma di procaspasi-12 e per essere

attivata deve subire il taglio da parte di proteasi presenti sulla membrana del reticolo, inoltre, un aumento dei livelli di calcio intracellulare causa l'attivazione e la mobilitazione delle calpaine che vanno ad attivare la caspasi-12. Questa a sua volta attiverà la caspasi-3 e altre caspasi come la -7 e la -9 dando il via alla successiva cascata di eventi apoptotici (Nakagara et al. 2000; Rao et al., 2002; Orrenius, 2003) (Fig. 13).

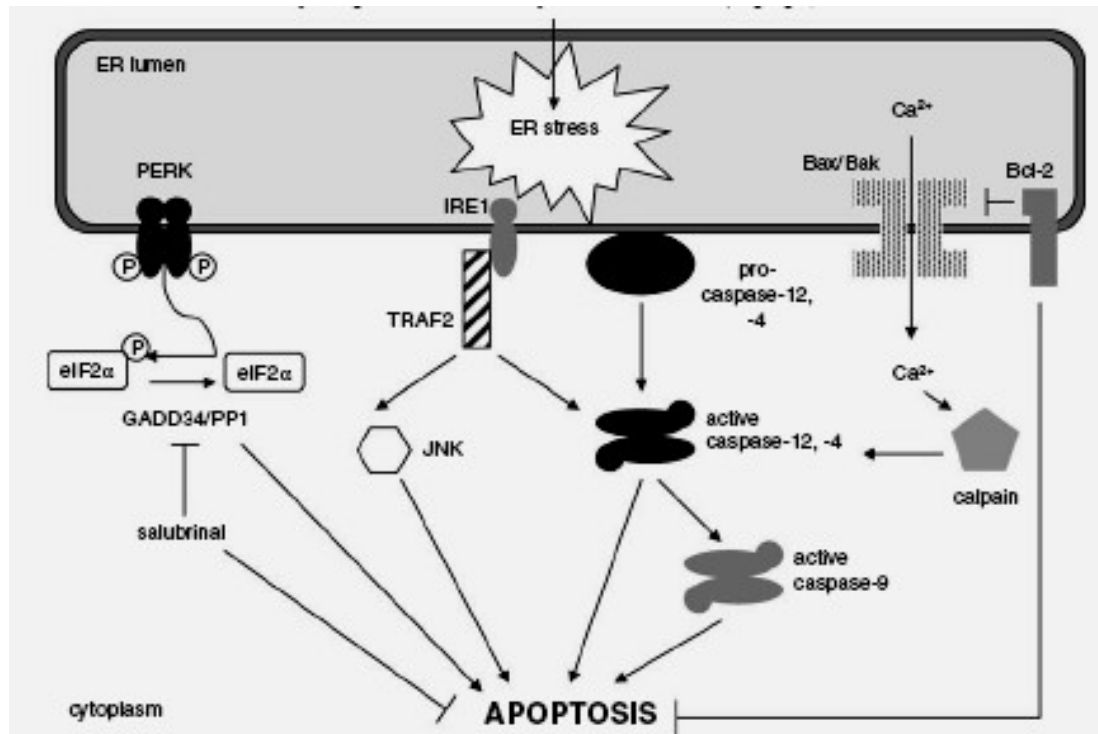


Figura 13: schema della via intrinseca del reticolo endoplasmatico. (Boyce & Yuan, 2006).

1.5 MOLECOLE COINVOLTE NEL PROCESSO APOPTOTICO

Dipendentemente dallo stimolo apoptotico, il processo di morte prevede l'attivazione di uno o più pathway nei quali intervengono numerose molecole segnale. Si conoscono due grandi famiglie di proteine implicate in questo processo, quella delle caspasi e quella del Bcl-2 (B-cell lymphoma gene 2) (Breckenridge & Xue, 2004; Shiozaki & Shi, 2004; Ward et al., 2004; Kim, 2005; Lindsten et al., 2005). Oltre a queste due grandi categorie ve ne sono altre che hanno la funzione di modulare la morte cellulare programmata con effetto pro- o anti-apoptotico, inoltre, intervengono anche altri fattori come per esempio lo ione Ca^{2+} .

1.5.1 Le caspasi: le esecutrici centrali

Durante il processo apoptotico la maggior parte dei cambiamenti morfologici e biochimici della cellula sono ad opera delle caspasi. Queste molecole sono una famiglia di proteasi citosoliche che presentano e nel sito attivo (chiamate anche cistein-proteasi). Le caspasi sono evolutivamente conservate, già a partire dal nematode *Caenorhabditis Elegans* fino all'uomo (Marks & Berg, 1999).

Questi enzimi tagliano il substrato proteico, dopo un residuo di acido aspartico. La specificità di substrato è data da una sequenza di quattro residui amminoterminali presenti nel sito di taglio (Gorman et al., 1998; Strasser et al., 2000).

Le caspasi sono divise in due categorie, le prossimali o iniziatrici (caspasi-1, -2, -4, -5 -8, -9, -10, -12 e -14) e quelle terminali o effettrici (caspasi-3, -6, -7, 11, -13) (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003). Queste cistein proteasi sono regolate a livello post-traduzionale, in modo che esse

possano essere velocemente attivate al bisogno. Dapprima sono sintetizzate in una forma zimogena inattiva, chiamata “pro-caspasi”, la quale è una singola catena costituita da tre domini, un pro-dominio N-terminale, un dominio p20 considerato l’unità maggiore e un’unità minore in peso molecolare chiamato dominio p10 (Hengartner, 2000) (Fig. 14a).

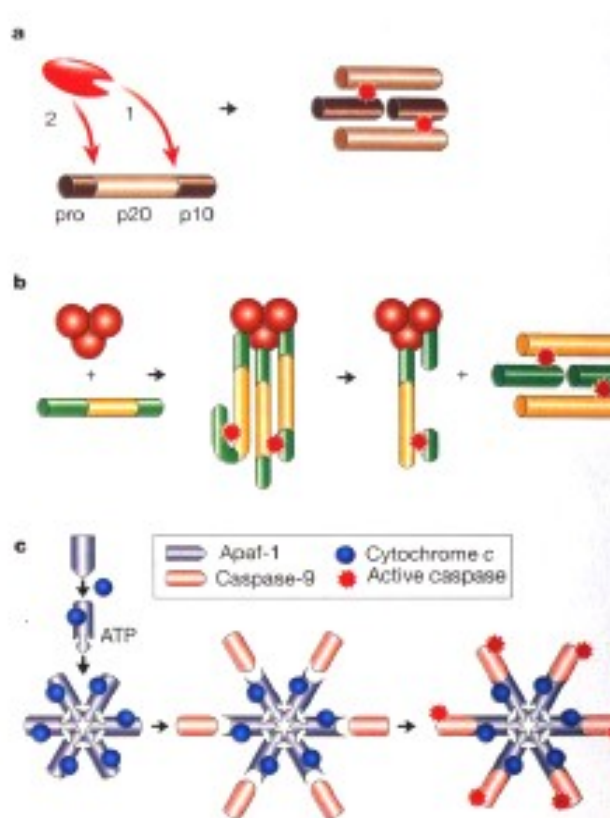


Figura 14: meccanismi di attivazione delle caspasi. a) attivazione per taglio proteolitico; b) attivazione da contatto; c) attivazione per associazione con altre proteine (Hengartner, 2000).

La forma attiva è formata da due eterodimeri p20/p10 legati a dare un tetramero con due siti attivi. Esistono diverse modalità di attivazione delle caspasi, per taglio proteolitico, per contatto o per associazione con altre proteine. Le iniziatrici vengono attivate per contatto, esse hanno un pro-dominio lungo che permette loro di legarsi con le proteine adattatrici unite al recettore di membrana, questo complesso richiama molte molecole di procaspasi (es. la procaspasi-8), la bassa attività biologica delle forme zimogene unite insieme, è sufficiente ad attivarle reciprocamente (Fig.

14b). Altre invece come la procaspasi-9 necessitano dell'associazione con altre molecole (vedi la formazione dell'apoptosoma) (Fig. 14c). Le caspasi terminali infine, possiedono dei pro-domini corti e devono essere attivate con taglio proteolitico (Hengartner, 2000) (Fig. 14a).

I segnali apoptotici indotti da vari stimoli convergono all'attivazione delle caspasi iniziatrici le quali a loro volta andranno ad attivare quelle effettrici. Quest'ultime, in particolare la caspasi-3, agiscono modificando processi biologici di importanza vitale per le cellule, tagliando diversi tipi di molecole. La caspasi-3 è in grado di indurre la degradazione del DNA in modo indiretto legandosi ad un inibitore delle endonucleasi (Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease= ICAD) il quale è normalmente legato ad una endonucleasi attivata da caspasi (CAD). La scissione del legame ICAD-CAD, ad opera della caspasi-3, rende l'endonucleasi libera di agire e quindi di tagliare il DNA in frammenti di 180pb, o multipli interi, evidenziabili mediante gel di agarosio, come un ladder nucleosomale (Enari et al., 1998). Anche i caratteristici cambiamenti morfologici sono conseguenza dell'azione delle cistein proteasi effettrici, infatti agiscono anche su molecole del citoscheletro (es: actina, laminina, gelsolina e fodrina) (Marks & Berg, 1999), su molecole segnale (es: Akt-1, PKC δ), e su enzimi di riparazione (es. poli-ADP-ribosio polimerasi, PARP). Anche l'esternalizzazione della fosfatidilserina dipende dall'attività delle caspasi (Böhm & Schild, 2003).

1.5.2 La famiglia di Bcl-2

L'attività apoptogenica del mitocondrio è regolata da membri appartenenti alla famiglia del Bcl-2, il nome è legato al primo componente scoperto, il Bcl-2, definito come un protooncogene presente sulla traslocazione cromosomica T(14; 18) del linfoma follicolare (Tsujimoto et al., 1985).

Fino ad oggi sono stati identificati più di 20 membri appartenenti a questa famiglia e classificati sulla base di sequenze-elica conservate, conosciute come domini di omologia Bcl-2 (da BH1 a BH4) (Scorrano & Korsmeyer, 2003). In questa famiglia, oltre al Bcl-2 si conoscono numerose proteine, con funzione pro- o anti-apoptotica. Le anti-apoptotiche possiedono tutti e quattro i domini BH e vi fanno parte Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl1 (o A1), BHRF e Mcl-1, inoltre, esse possiedono un dominio C-terminale idrofobico che le ancora a diverse membrane, quella mitocondriale, come quella del reticolo endoplasmatico e quella nucleare. Le proteine pro-apoptotiche invece, vengono suddivise in due sottofamiglie. La prima è la Bax che possiede i domini BH1, BH2, e BH3 e comprende le proteine Bax, Bak, e Bok, la seconda sottofamiglia ha la caratteristica di possedere solo il dominio BH3, a questo gruppo appartengono le proteine Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 e Spike (Cory & Adams, 2002; Mund et al., 2003) (Fig. 15).

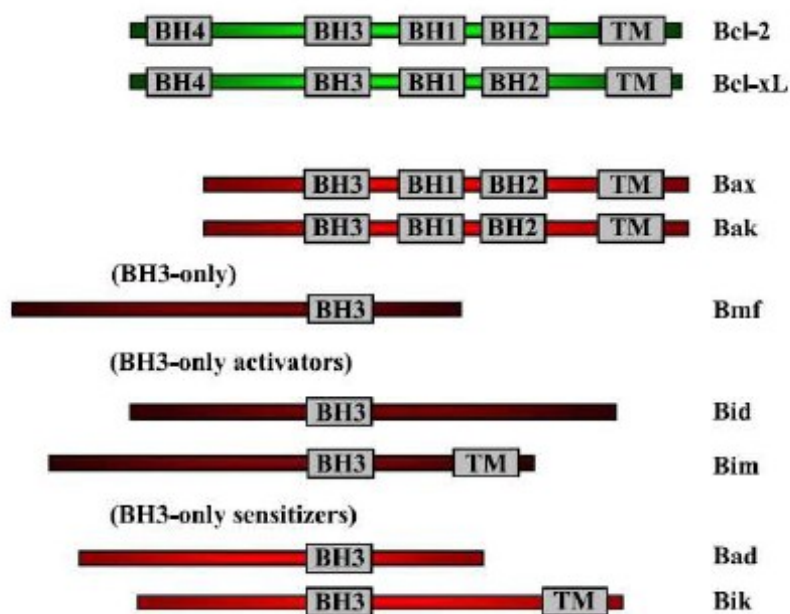


Figura 15: struttura dei vari componenti della famiglia del Bcl-2. TM: dominio di transmembrana (Martin & Vuori, 2004).

Le forme pro-apoptotiche sono normalmente presenti libere nel citoplasma di cellule quiescenti, ma sotto stimolo possono anche legarsi alle membrana mitocondriale o a proteine ivi presenti (Wolter et al., 1997).

Molte proteine della famiglia Bcl-2 interagiscono fra di loro creando degli omodimeri, eterodimeri ed oligomeri agendo sia da agonisti, sia da antagonisti per i loro partners. L'interazione avviene attraverso il dominio BH3 (Gross et al., 1999). Diversi studi evidenziano come il rapporto tra proteine pro- e anti-apoptotiche, nella formazione sia degli omodimeri sia degli eterodimeri, determina la "sensibilità" della cellula agli stimoli apoptotici e sembra alla base della scelta tra la sopravvivenza o la morte cellulare (Oltvai & Korsmeyer, 1994; Yang & Korsmeyer, 1996; Nagata, 1997).

Queste proteine modulano il processo apoptotico controllando direttamente l'attivazione delle caspasi (Strasser et al., 2000) oppure agendo sull'integrità del mitocondrio controllando il rilascio di proteine nel citoplasma (Wang, 2001), quest'ultima nei mammiferi sembra essere la funzione centrale (Cory & Adams, 2002).

Importanti sono le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak. Nella cellula sana Bax è libero nel citoplasma e Bak è legato alla membrana del mitocondrio, sotto uno stimolo apoptotico Bax cambia conformazione e si inserisce sulla membrana mitocondriale dimerizzando con Bak e contribuendo alla formazione di pori in modo diretto o interagendo con altre componenti della membrana come i canali anionici voltaggio dipendenti (Voltage-Dependent Anion Channel= VDCA) (Antonsson et al., 2000; Tsujimoto & Shimizu, 2000) (Fig. 16).

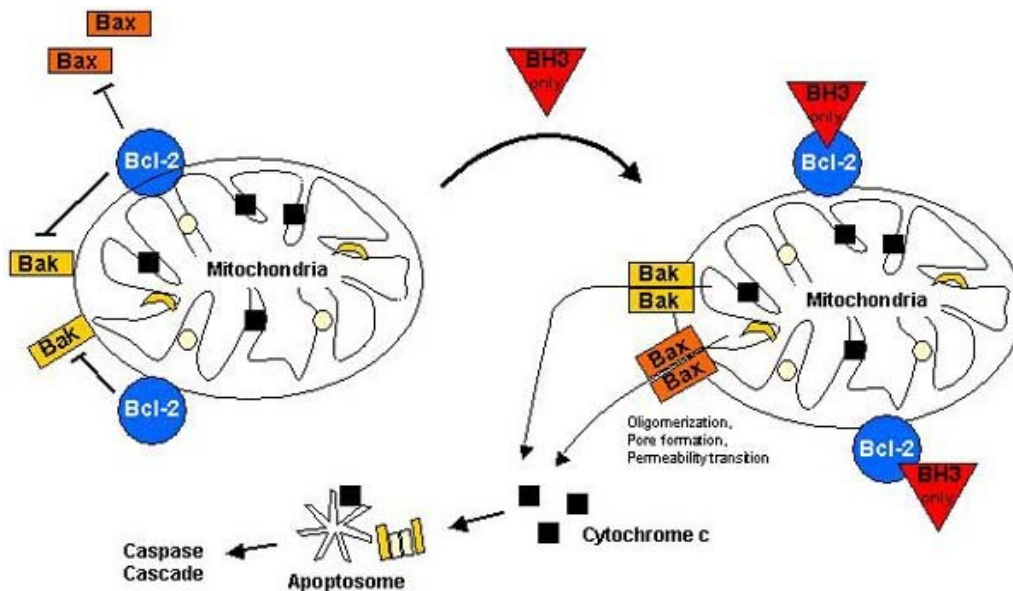


Figura 16: regolazione dell'apoptosi da parte delle proteine della famiglia Bcl-2 (Gewies, 2003).

Al contrario, la proteina anti-apoptotica Bcl-2 è in grado di sequestrare i membri pro-apoptotici della famiglia per interazione dei domini BH3, prevenendo così l'attivazione di Bax o Bak ed inibendo di conseguenza gli eventi apoptotici a carico del mitocondrio (Fig. 16). Bcl-2, controlla il flusso in entrata e in uscita degli ioni (come il Ca^{2+}) e di piccole molecole e infine, protegge le cellule dall'apoptosi inibendo il rilascio di citocromo-C dal mitocondrio, sequestrando la proteina Apaf-1 o bloccando l'attivazione della caspasi-9 (Yang & Korsmeyer, 1996; Minn et al., 1997; Rossè et al., 1998; Zhivotovsky, 1998; Kim, 2005). Questa molecola come le altre anti-apoptotiche può interagire anche con altre proteine implicate nel pathway apoptotico grazie alla presenza del dominio BH4 (Wang et al. 1996; Shibasaki et al., 1997) regolando vari processi come l'omeostasi del calcio (Lam et al., 1994; Marin et al., 1996), la modulazione della via degli antiossidanti (per inibire l'induzione dell'apoptosi ad opera dei ROS) (Hockenbery et al., 1993; Liang et al., 2000) e promuovendo il sequestro del glutatione dal nucleo (Voehringer et al., 1998).

Una sovra espressione di Bcl2 e Bcl- X_L è in grado di inibire l'apoptosi (Reed, 1998). L'inattivazione delle proteine anti-apoptotiche può avvenire per fosforilazione dovuta per esempio all'azione di chemioterapici

(Haldar et al., 1995; Poruchynsky et al., 1998) o per via enzimatica; esse, sotto uno stimolo apoptotico, vengono clivate dalle caspasi, che così eliminano il dominio BH4 e rendono libero il BH3, trasformandole in pro-apoptotiche (Cheng et al., 1997; Fujita et al., 1998, Fadeel, 1999). Il clivaggio di Bcl-2 o di Bcl-X_L può essere operato anche dalle calpaine (Gil-Parrado et al., 2002).

I membri della famiglia che possiedono solo il dominio BH3 sono necessari per l'attivazione di Bak/Bax (Bouillet & Strasser., 2002) (Fig. 15). Inoltre, partecipano attivamente nelle diverse vie apoptotiche, per esempio Bid, che normalmente è presente nel citosol, dopo l'attivazione della via estrinseca viene attivato dal taglio proteolitico operato dalla caspasi-8. Il Bid troncato (t-Bid) riesce così ad inserirsi nella membrana mitocondriale favorendo il rilascio del citocromo-C (Goping et al. 1998; Cory & Adams, 2002; Scorrano et al., 2002) (Fig. 12). L'attività della proteina Bad invece, è regolata da processi di fosforilazione e defosforilazione (Zha et al., 1996). In assenza di segnali di sopravvivenza o in risposta ad un flusso in entrata di ioni Ca²⁺ Bad viene defosforilato, così è in grado di legarsi tramite il dominio BH3 a membri anti-apoptotici della famiglia presenti sul mitocondrio (Bcl-2/BclX_L), favorendo la morte cellulare. Quando alla cellula arrivano dei fattori trofici, Bad viene fosforilato ed in questa fase lega la proteina 14-3-3 restando libero nel citosol e inattivo (Datta et al., 1997; Harada et al., 1999; Wang et al., 1999). Bim invece è normalmente presente sui microtubuli e durante l'apoptosi trasloca sulla membrana esterna del mitocondrio (Gupta, 2001).

1.5.3 Altre proteine pro-apoptotiche e/o anti-apoptotiche

Le fasi molecolari e biochimiche dell'apoptosi sono complesse e coinvolgono molteplici molecole che possono avere sia funzione pro-apoptotica sia anti-apoptotica. Una migliore conoscenza di queste molecole, del loro pathway di espressione e delle loro interazioni possono essere utili per trovare nuove strategie terapeutiche per curare vari disturbi e patologie.

1.5.3.1 Le protein chinasi C

Tra le proteine serin/treonin chinasiche che partecipano a varie vie di trasduzione di segnali intracellulari si colloca la famiglia delle protein chinasi C (PKC) (Parker & Dekker, 1997); esse sono coinvolte nella trascrizione genica, nel differenziamento, nella regolazione del ciclo cellulare, nelle funzioni del citoscheletro, nella risposta ai fattori di crescita, nell'interazione cellula-cellula, nella resistenza a farmaci e nell'apoptosi (Rybczynska et al., 2000; Goekjian & Jirousek, 2001). La loro azione regolatrice si compie fosforilando dei residui di serina/treonina su molecole bersaglio tra le quali vi sono i recettori di membrana, enzimi, proteine contrattili, altre chinasi e fattori di trascrizione (Nishizuka, 1986; Idris et al., 2001). L'azione specifica delle varie isoforme è data dalla loro localizzazione cellulare in stretta prossimità dei substrati specifici (Mackay & Monchly-Rosen, 2001).

La famiglia delle PKC è divisibile in tre sottofamiglie ognuna con diverse isoforme, tale divisione è data in base alla loro struttura, alla diversa modalità con cui queste proteine vengono attivate e regolate e dalla loro distribuzione tessutale (Stabel & Parker, 1991; Nishizuka, 1995; Mellor & Parker, 1998). La prima sottofamiglia è quella delle protein chinasi C convenzionali (PKCc), essa comprende le isoforme α , β I, β II e γ , per la loro funzionalità necessitano della presenza di ioni Ca^{2+} e vengono attivate dal diacilglicerolo (DAG), dalla fosfatidilserina (PS) e dagli esteri del forbolo.

Le PKC nuove (PKCn) sono la seconda sottofamiglia formata dalle isoforme δ , θ , ε e η , le quali hanno attività indipendente dal calcio ma dipendente dal DAG, dalla PS e dagli esteri del forbolo. Infine, l'ultima sottofamiglia, le PKC atipiche (PKCa), hanno attività indipendente sia dal calcio che dal diacilglicerolo, la loro attivazione dipende esclusivamente dalla fosfatidilserina, anche se è documentato che molecole come lipidi (es: ceramide) e altri co-fattori possono modulare le loro funzioni; tra le PKCa si conoscono le isoforme ζ , λ e ι (Poweel et al., 1996).

Dal punto di vista strutturale tutte le PKC sono costituite da una singola catena polipeptidica che è divisibile in due regioni, una regolatrice N-terminale di 20-70kDa e una catalitica o chinasi c-terminale di 45kDa (Newton, 1995, 1997; Nishizuka, 1995). Ogni regione è costituita da diversi domini. La porzione regolatrice contiene un dominio pseudosubstrato autoinibitorio, un dominio C1 che grazie a due sequenze zinc-finger ricche in cisteina è in grado di legare il DAG e gli esteri del forbolo (Liu & Heckman, 1998), infine, vi è un dominio C2 che lega il calcio e gli acidi fosfolipidici (Nishizuka, 1992, 1995; Spitaler & Cantrell, 2004). Nelle PKCa il dominio C1 è incompleto perché formato da una sola sequenza zinc-finger, mentre il dominio C2 è assente in questa sottofamiglia come nelle PKCn (Gutcher et al., 2003). La regione catalitica invece, contiene il dominio C3 che lega ATP e il dominio C4 che è un sito di legame specifico per il substrato ma che interagendo con il dominio di pseudosubstrato mantiene le PKC in forma inattiva (Fig. 17) (Nishizuka, 1992, 1995; Spitaler & Cantrell, 2004).

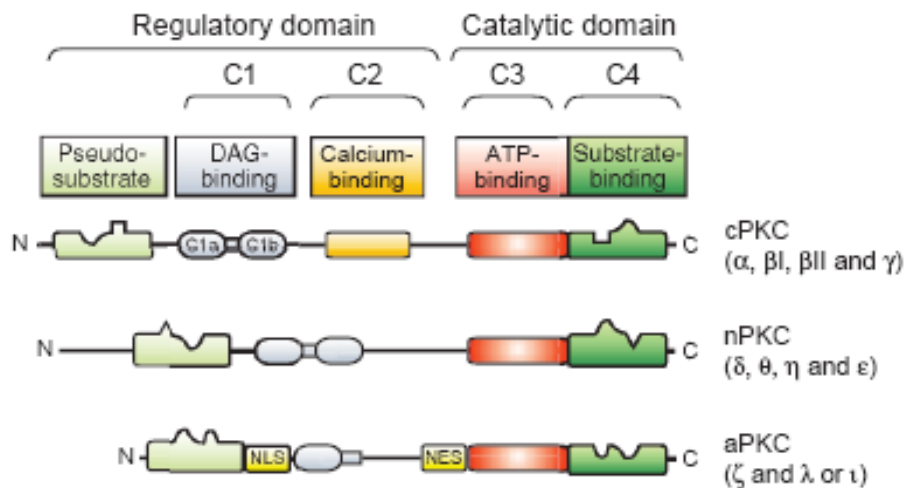


Figura 17: schema della struttura delle tre sottofamiglie di PKC (Spitaler & Cantrell, 2004).

Le protein chinasi C possono essere attivate secondo due meccanismi sequenziali, il primo è la loro fosforilazione ad opera del PDK-1 (3-phosphoinoside-dependent kinase), il secondo è il legame con il diacilglicerolo. Ognuno di questi meccanismi regola la struttura, la localizzazione subcellulare e la funzione delle PKC (Dempsey et al., 2000; Newton, 2003).

Nella regolazione delle PKC il primo evento è la fosforilazione delle proteine neo-sintetizzate in tre posizioni conservate entro il dominio catalitico, passando da un peso iniziale di circa 76kDa della forma inattiva a quello di circa 80kDa per la proteina matura. Il primo residuo di treonina (Thr 500) che viene fosforilato si trova nel sito attivo del dominio C4, questo essendo carico negativamente non è in grado di autofosforilarsi pertanto subisce il processamento da parte di un'altra chinasi, la PDK-1. Questo evento è seguito dall'autofosforilazione di due amminoacidi della porzione carbossi-terminale (Thr 641 e Ser 660) a cui segue il rilascio nel citoplasma della proteina matura ma inattiva. Nella forma inattiva le PKC hanno una struttura "chiusa" a causa del legame tra il dominio pseudosubstrato che va ad occupare il sito catalitico del dominio C4 (Dempsey et al., 2000; Newton, 2003).

Le PKC ϵ e PKC η per essere attivate devono migrare sulla membrana citoplasmatica e legarsi al DAG, anche se alcune isoforme attive sono state documentate associate alla F-actina del citoscheletro (Goodnight et al., 1995; Prekeris et al., 1998) o traslocate nella regione perinucleare o entro il nucleo (Goodnight et al., 1995; Martelli et al., 1999; Neri et al., 1999).

Nel caso delle protein chinasi C convenzionali il meccanismo di attivazione prevede che ci sia un segnale che causi un aumento della concentrazione dello ione Ca²⁺ nel citoplasma. Il calcio legandosi al dominio C2 della PKC ϵ ne permette la migrazione verso la membrana, e ne favorisce l'ancoraggio (Nalefski & Newton, 2001; Schaefer et al., 2001). A questo segue il legame del DAG con il dominio C1, ciò aumenta l'affinità della PKC per la PS dando così una unione forte e stabile della proteina alla membrana (Newton, 1997). L'energia di questa interazione causa un cambiamento conformazionale della protein chinasi C che si "apre" e diventa attiva perché viene liberato il sito catalitico specifico in C4, in grado così di interagire con i vari substrati proteici (Dempsey et al., 2000; Newton, 2003) (Fig. 18).

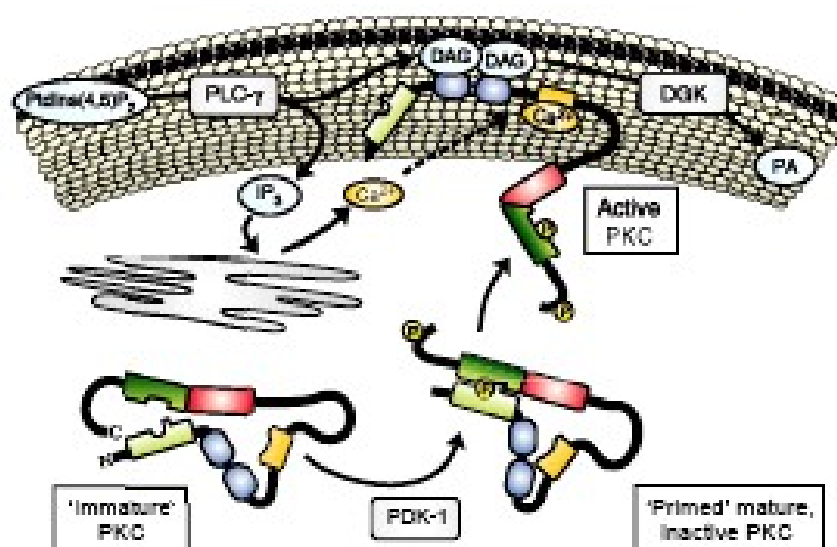


Figura 18: meccanismo di maturazione e di attivazione delle PKC ϵ . (Spitaler & Cantrell, 2004).

Nel caso delle PKC η non avendo il dominio C2 non riescono ad essere indirizzate dal calcio in prossimità della membrana, pertanto esse vi traslocheranno con molta meno frequenza delle PKC ζ (Schaefer et al., 2001). L'unica forma di regolazione delle PKC α conosciuta al momento è quella della fosforilazione (Standaert et al., 2001).

L'effetto dell'attivazione delle PKC è isoforma specifico e dipende dalla durata dell'attività chinasi, dalla loro localizzazione e dai segnali cellulari che concorrono con la sua attività (Goekjian & Jirousek, 2001).

Le PKC sono anche molto sensibili alla presenza di ROS. I motivi zic-finger del dominio regolatore sono ricchi di cisteine che vengono ossidate dai perossidi (Gopalakrishna & Gundimeda, 2002); tale ossidazione rimuove l'autoinibizione del dominio C4 causando una attivazione anomala della proteina. Il dominio catalitico invece, contiene cisteine reattive che sono bersagli di molecole antiossidanti come la vitamina-E e suoi analoghi; la riduzione di queste cisteine causa una diminuzione dell'attività delle PKC (Gopalakrishna & Jaken, 2000; Gopalakrishna & Gundimeda, 2002).

Per quanto concerne il coinvolgimento delle protein chinasi C nel processo apoptotico il loro ruolo risulta controverso in quanto sono in grado di stimolare l'apoptosi come di inibirla. In generale, le isoforme delle PKC classiche e atipiche sono considerate anti-apoptiche, mentre quelle delle PKC η vengono ritenute pro-apoptiche in particolare la PKC σ (Deacon et al., 1997; Dempsey et al., 2000).

Per quanto riguarda l'isoforma α è stata documentata la sua capacità anti-apoptica in numerose linee cellulari come quella tumorale U937 (Whelan & Parker, 1998), le cellule di glioblastoma (Dooley et al., 1998) e le cellule endoteliali (Haimovitz-Friedman et al., 1994), inoltre, la sua espressione aumenta in svariati casi di tumore (Lord & Pongracz, 1995), mentre l'induzione dell'apoptosi da parte della ceramide sembra defosforilare la PKC α e quindi inibire la sua attività (Lee et al., 1996). Il meccanismo con il quale questa proteina interviene nell'inibire l'apoptosi

non è ancora chiaro ma sembra essere in grado di agire sul Bcl-2 aumentando l'attività anti-apoptotica (Ito et al., 1997; Ruvolo et al., 1998). Anche la proteina mitocondriale Raf-1 è un potenziale target di PKC α (Majewski et al., 1999).

Tra la superfamiglia delle PKC atipiche è documentata come l'espressione della isoforma ζ diminuisce nelle U937 indotte all'apoptosi da farmaci (Pongracz et al., 1995), inoltre, nelle HL-60 in apoptosi indotta da UV, questo isoenzima viene tagliato dalla caspasi-3 (Frutos et al., 1999). Nel 2007, Charruyer e i suoi collaboratori dimostrano che nelle U937, la PKC ζ sopprime l'apoptosi, proteggendo le cellule da un danno provocato dall'esposizione ai raggi ultravioletti. Una sovraespressione del gene, sempre in cellule tumorali, produce una sopravvivenza cellulare proteggendole dalla induzione della formazione di radicali liberi.

L'isoforma più conosciuta per la sua capacità di promuovere l'apoptosi è la δ , anche se in alcuni casi è stata documentata la sua capacità anti-apoptotica (Jun et al., 1999; Wert & Palfrey, 2000; Peluso et al., 2001; Kilpatrick et al., 2002; Zrachia et al., 2002). Molti studi associano la crescita tumorale alla mancanza di questo isoenzima (Lu et al., 1997) mentre una sua sovraespressione e/o attivazione è associata all'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M (Watanabe et al., 1992; Griffiths et al., 1996). L'attivazione dell'isoforma δ sembra partecipare al processo apoptotico indotto da vari agenti che causano stress, tra i quali vi è il cisplatino. (Basu & Akkaraju, 1999; Basu et al., 2001). Sia il cis-DDP come altri agenti che causano apoptosi, inducono il taglio della PKC δ da parte della caspasi-3, questo evento causa la formazione di frammenti di 40kDa che sono altamente attivi ed in grado di amplificare la risposta apoptotica (Basu & Akkaraju, 1999; Basu et al., 2001). Il taglio ad opera della caspasi-3 sembra avvenire a livello nucleare (Blass et al., 2002). Allo stesso tempo la proteina non tagliata agisce anche a monte della caspasi-3 in particolare nei primi stadi della via intrinseca mitocondriale (Basu et al., 2001; Villalba

et al., 2001). La PKC δ sembra anche intervenire nell'esposizione della fosfatidilserina sulla porzione esterna della membrana plasmatica, ad esempio nelle cellule Jurkat la isoforma δ attivata e/o tagliata dalla caspasi-3 provoca un aumento del meccanismo a "flip-flop" (Frasch et al., 2000).

Le PKC α , ζ e δ sono espresse nella maggior parte dei tessuti e sono state considerate avere una funzione chiave di sensori molecolari, in grado di regolare l'apoptosi promuovendola in cellule danneggiate o inibendola sotto condizioni favorevoli alla sopravvivenza (Cross et al., 2000; Dempsey et al., 2000).

1.5.3.2 Gruppo delle MAPK

Oltre alle PKC, nelle vie che regolano la morte cellulare e la sopravvivenza partecipano anche delle altre proteine serin/treonin chinasiche appartenenti alla famiglia delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases). Queste proteine comprendono tre sottofamiglie, quella delle ERK (Extracellular Signal-Regulate Kinase), quella del JNK (c-Jun NH₂-terminal Kinase) e quella della p38 (stress activated protein kinase 2). Le MAPK per essere attive devono essere a loro volta fosforilate secondo una specifica cascata di eventi catalizzata da altre MAPK (Wada & Penninger, 2004). Molti lavori evidenziano che l'apoptosi indotta dalla produzione di ROS prevede l'attivazione delle MAPK (Feuerstein & Young, 2000; Yoshizumi et al., 2001).

Nel gruppo delle ERK si contano otto isoforme (ERK-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 e -8) (Yoon & Seger, 2006), le più studiate sono le ERK1/2 (41-42kDa). L'attivazione di queste proteine viene avviata tramite segnali che giungono ai recettori tirosin-chinasici presenti sulla membrana citoplasmatica (McKay & Morrison, 2007). Questi segnali, vengono in parte incanalati attraverso la cascata Raf1-MEK1/2, le quali fosforilano e quindi attivano le ERK1/2 (p-ERK1/2) (Marshall, 1995; Murphy & Blenis, 2006).

In funzione della linea cellulare di studio, il tipo di stimolo e la durata dell'attivazione, le ERK sono in grado di intervenire in diverse risposte biologiche come la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare agendo principalmente da molecole pro-apoptotiche ma anche come anti-apoptotiche (Choi et al., 2004; Zhuang & Schellmann, 2006).

Il loro ruolo nel processo apoptotico si esplica in risposta a vari stimoli stressori, come quelli che inducono ipossia (Buckley et al., 1999), quelli dovuti alla sottrazione di fattori di crescita (Erhardt et al., 1999) al trattamento con acqua ossigenata o altri agenti ossidanti (Wang et al., 1998) e con chemioterapici (Anderson & Tolkovsky, 1999). In merito al trattamento con il cisplatino in molti casi è stata documentata la capacità anti-apoptotica delle ERK (Hayakawa et al., 1999; Person et al., 1999; Cui et al., 2000; Novak, 2002; Kim et al., 2005), mentre altrettanti studi evidenziano un effetto opposto (Wang et al., 2000; Jung et al., 2002; Woessmann et al., 2002; Choi et al., 2004). La caspasi-3 è in grado di tagliare e inattivare Raf-1, un attivatore a monte della via delle ERK, questo comporta una inibizione della attività protettiva di quest'ultime (Widmann et al., 1999a). Secondo Zhuang & Schnellmann (2006), le ERK agiscono invece, a monte della via mitocondriale regolando Bax e p53 e sopprimendo i segnali di sopravvivenza. La capacità di attivare o inibire l'apoptosi da parte delle ERK sembra legata alla durata della loro fosforilazione, se lo stimolo che arriva alla cellula causa una rapida e breve attivazione di queste proteine esse hanno una funzione protettiva (Guyton et al., 1996; Aikawa et al., 1997), se invece l'attivazione è tardiva e prolungata esse mediano il pathway dell'apoptosi (Jimenez et al., 1997; Wang et al., 2000).

Il JNK e la p38 regolano l'espressione genica promuovendo l'apoptosi in risposta a stress chimici e ambientali e segnali infiammatori (Brenner et al., 1997; Wang et al., 1998) sono altresì stimulate da farmaci e da chemioterapici come il cisplatino (Kharbanda et al., 1995; Liu et al. 1996;

Osborn & Chamers, 1996). Nei mammiferi ci sono tre geni JNK1, JNK2 e JNK3 che codificano per le isoforme di JNK. Il JNK1 e il JNK2 sono espressi in gran parte dei tessuti, mentre il JNK3 è presente solo nel cervello, nel cuore e nel testicolo. Ogni gene codifica per proteine di 46-55kDa (Davis, 2000).

Il JNK viene attivato tramite fosforilazione (p-JNK) ad opera di due enzimi, il MKK4 e il MKK7, mentre la sua azione si esplica principalmente fosforilando dei fattori di trascrizione (Davis, 2000).

Questa proteina è in grado di promuovere l'apoptosi fosforilando e attivando la p53, ma il maggior target della via di segnale del JNK è l'attivazione del fattore di trascrizione AP-1 ad opera del c-Jun. Il p-JNK si lega col dominio N-terminale al quello di attivazione del c-Jun, fosforilandolo, quest'ultimo così attivato aumenta la trascrizione di AP-1 (Pulveree et al., 1991; Smeal et al., 1991). La via pro-apoptotica JNK/AP-1 sembra promuovere l'apoptosi aumentando l'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bak (Fan & Chambers, 2001) e la trascrizione e attivazione del FasL (Xia et al., 1995). Il JNK è normalmente presente a livello citoplasmatico, ma per regolare i fattori di trascrizione deve traslocare nel nucleo (Mizukami et al., 1997; Aplin et al., 2002) oppure, può migrare sul mitocondrio dove attiva proteine pro-apoptotiche come Bad (Donovan et al., 2002) e Bax (Mandal et al., 2001) e inattiva il Bcl-2 (Kharbanda et al., 2000), inoltre, induce il rilascio di proteine pro-apoptotiche come Smac/Diablo (Chauban et al., 2003). Per la traslocazione al nucleo o al mitocondrio del JNK è indispensabile la sua fosforilazione (Eminel et al., 2004). La caspasi-3 è in grado di agire a monte del JNK attivando le chinasi specifiche per questa proteina, amplificandone il segnale (Cardone et al., 1997).

La produzione di ROS altera l'attività del JNK, in quanto un aumento dei livelli intracellulari di radicali liberi dell'ossigeno causa una maggiore fosforilazione e quindi la sua attivazione (Vlahopoulos & Zoumpourlis,

2004), che può essere, in alcuni sistemi mediata dal calcio intracellulare (Inanami et al., 1999a, 1999b) e in altri no (Wilson et al., 1996).

Anche per il JNK come per le ERK alcuni autori associano la sua attivazione in risposta al trattamento con il cisplatino in alcuni casi come un evento protettivo, anche se il suo ruolo principale è pro-apoptotico (Zanke et al., 1996; Hayakawa et al., 1999; Davis, 2000). La durata dell'attivazione del JNK come quella della p38 ad opera del cisplatino sono determinanti per la sopravvivenza o l'apoptosi cellulare, infatti, una prolungata attivazione di entrambe le proteine comporta danni ingenti e la morte cellulare (Mansouri et al., 2003; Yang et al., 2003) mentre un'attivazione transiente media i segnali di sopravvivenza (Chen & Tan, 2000).

Nella via di attivazione del JNK sembrano coinvolte anche diverse isoforme di PKC che agiscono in modo cellula e stimolo dipendente (Hagemann & Blank, 2001).

1.5.3.3 Proteine della famiglia 14-3-3

Le 14-3-3 sono una famiglia di proteine multifunzionali altamente conservate e espresse in tutti gli eucarioti. Sono conosciute per la loro capacità di legare una grande varietà di proteine, sono stati documentati più di 70 ligandi che comprendono le chinasi, le fosfatasi, le proteine recettoriali, alcune proteine strutturali e fattori di trascrizione. Il loro nome deriva dalla loro migrazione caratteristica in un gel elettroforetico (Fu et al., 2000).

Principalmente si trovano localizzate libere nel citoplasma, alcune sono state documentate anche associate alla membrana citoplasmatica o all'interno di organelli cellulari come l'apparato del Golgi (Celi et al., 1990; Tang et al., 1998).

Nei mammiferi si conoscono sette geni che codificano sette isoforme, le 14-3-3- β , - γ , - ϵ , - η , - δ , - τ/θ e - ζ . (Ichimura et al., 1988; Martin et al., 1993). Strutturalmente queste proteine del peso di circa 30kDa sono

costituite da nove alfa eliche organizzate in una maniera antiparallela che dona loro una forma a coppa con una superficie concava altamente conservata in tutte le isoforme e una esterna variabile (Fu et al., 2000) (Fig. 19).

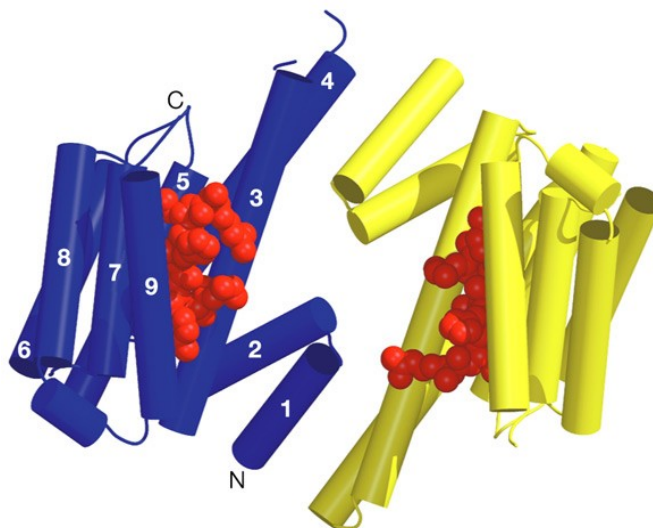


Figura 19: rappresentazione schematica della struttura dei dimeri creati dalle proteine della famiglia 14-3-3. (Berg et al., 2003)

Queste proteine hanno la capacità di creare omo e eterodimeri tramite la loro parte amminoterminale, questi dimeri delimitano un foro centrale di 6-8Å (Jones et al., 1995). Esse contengono diversi domini utili per l'interazione con i cationi divalenti, per la fosforilazione e l'acetilazione e per il taglio proteolitico. La maggior parte dei ligandi delle 14-3-3 devono essere fosforilati prima dell'interazione con queste proteine, sono state infatti, definite delle regioni consenso che riconoscono dei motivi fosfoserinici di legame (Muslin et al., 1996; Pawson & Scott, 1997; Yaffe et al., 1997). La necessita di legarsi con molecole che sono state fosforilate permette un controllo del legame 14-3-3/ligando da parte di chinasi e fosfatasi implicate nei networks cellulari. In realtà è documentato come le 14-3-3 possano interagire anche con proteine non fosforilate (Fu et al., 2000).

Questa grande varietà di molecole con cui interagiscono ha suggerito come le 14-3-3 intervengano in vari processi biologici vitali, come la mitogenesi, il controllo del ciclo cellulare, segnali di sopravvivenza, l'adesione cellulare, la plasticità neuronale e l'apoptosi. Nel processo apoptotico è dimostrato che le 14-3-3 interagiscono con proteine direttamente coinvolte come Bad (Zha et al., 1996), o altre che partecipano in maniera più indiretta come Raf-1 (Salomoni et al., 1998), le proteinchinasi C (Reyland et al., 2000), il fosfatidilinositolo-3-fosfato (Toker, 2000) e le MAPKKK1 (mitogen-activate proteine kinase kinase 1) (Widmann et al., 1999b). Masters & Fu (2001) dimostrano come, in molte cellule, il legame tra le 14-3-3 e il ligando è un mediatore di un segnale anti-apoptotico il quale è in parte indirizzato al mantenimento dell'integrità mitocondriale. Le 14-3-3 agirebbero a monte del Bcl-2 ma a valle o in modo indipendente dai segnali di sopravvivenza chinasi Akt dipendenti. Inoltre l'uso di inibitori delle 14-3-3 in cellule trattate con cisplatino, le rende più sensibili all'azione apoptotica dell'antineoplastico Masters & Fu (2001). Probabilmente le 14-3-3 fungono da fattori di sopravvivenza generici con la funzione di aumentare i segnali pro-sopravvivenza e sopprimere il pathway apoptotico (Fu et al., 2000). La loro funzione è strettamente controllata attraverso la regolazione del livello di espressione di queste proteine e le modificazioni post-trascrizionali come la loro fosforilazione (Fu et al., 2000). Per esempio nelle cellule del tumore al colon-retto una sovraespressione dell'isoforma δ causa un arresto del ciclo cellulare nella fase G2 cosa che non avviene nel caso delle 14-3-3 β (Hermeking et al., 1997). Inoltre, è dimostrato che un aumento dell'espressione delle varie isoforme di 14-3-3 inibisce l'attività specifica delle PKC nelle cellule umane tumorali Jurkat-T (Hausser et al., 1999; Meller et al., 1996). Infine, molti ricercatori sostengono che una sovrapproduzione di 14-3-3 rende le cellule resistenti all'apoptosi (Chan et al., 1999; Zhang et al., 1999; Xing et al., 2000; Masters & Fu, 2001; Chen

et al., 2006). Le 14-3-3 possono essere fosforilate dalle PKC ($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$, e $-\zeta$) (Autieri & Carbone, 1999; Van der Hoeven et al., 2000) questo fenomeno causa per le isoforme β e ζ un aumento della loro capacità di inibire l'attività delle protein chinasi C (Aitken et al., 1995). Anche il JNK è in grado di fosforilare le 14-3-3 riducendo la loro affinità per Bad, quest'ultimo viene liberato nel citoplasma e reso quindi in grado di esplicare la sua attività apoptotica (Sunayama et al., 2005).

1.5.4 Il ruolo del calcio nel processo apoptotico

In tutti i tipi cellulari lo ione Ca^{2+} è un secondo messaggero molto importante per la trasduzione dei segnali intracellulari (Somlyo & Somlyo, 1994). Variazioni nella concentrazione del calcio hanno una importanza cruciale in molti processi vitali come nell'apoptosi. (McConkey et al, 1989; Orrenius et al. 1992). Un incremento incontrollato della concentrazione di calcio a livello citosolico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) causa un danneggiamento e la morte cellulare, questo fenomeno viene riscontrato anche in situazioni patologiche come danni ischemici e patologie al fegato (Kass & Orrenius, 1999).

La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ è tenuta sotto controllo e a bassi livelli in modo che ogni cellula, tessuto o organo possa esprimere la propria funzione (Somlyo & Somlyo, 1994; Ghosh & Greenberg, 1995). Esistono dei sistemi che permettono il mantenimento di un gradiente di concentrazione del Ca^{2+} entro la cellula; la membrana cellulare di per sé è impermeabile al calcio fungendo da barriera, ma su di essa sono anche presenti delle pompe per l'escrezione attiva dello ione, in grado di regolarne l'entrata e l'uscita. Infine, gli organelli cellulari come il reticolo endoplasmatico e i mitocondri sono dei veri e propri sistemi di stoccaggio del calcio (Borle, 1981). Un incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ può essere ottenuto da un rapido e transiente rilascio dello ione dalle riserve intracellulari, o da un lento flusso in entrata

dallo spazio extracellulare, quest'ultimo è considerato il meccanismo più importante (Poelaert & Roosens, 2000).

Nel caso della morte cellulare programata un moderato aumento della $[Ca^{2+}]_c$ è causa dell'attivazione delle endonucleasi calcio dipendenti che tagliano il DNA (Ghibelli et al., 2006); ma è altresì risaputo che tale aumento può agire sia come evento pro- che anti-apoptotico (Reuter, 1996). Come detto in precedenza nella via apoptotica del RE il calcio è implicato nell'attivazione della caspasi-12 ad opera delle calpaine (Chen et al., 2001). Inoltre, lo ione Ca^{2+} sembra essere una molecola target per l'azione anti-apoptotica del Bcl-2 (Lam et al., 1994; He et al., 1997). Un aumento della $[Ca^{2+}]_c$, causa l'attivazione di proteine citosoliche calcio dipendenti come le calpaine che agiscono a monte della catena apoptotica attivando Bax (Wood et al., 1998) o Bid (Chen et al., 2001; Mandic et al., 2002) e partecipando allo smantellamento del citoscheletro (Yoshida et al., 1995).

Cerella et al. (2007) hanno studiato le variazioni della concentrazione dello ione calcio sia a livello del reticolo endoplasmatico ($[Ca^{2+}]_{RE}$) sia citosolico su cellule umani tumorati, U937 e Jurkat. Hanno dimostrato che dal momento della induzione dell'apoptosi per arrivo di segnali esterni alla cellula, come shock termico o stress ossidativi, si osservano tre variazioni di queste concentrazioni che segnano delle tappe fondamentali del processo apoptotico.

La prima variazione che Cerella et al. (2007) documentano si osserva tra 0-2h dal trattamento ed è data da un aumento della $[Ca^{2+}]_c$ e una riduzione della $[Ca^{2+}]_{RE}$. Questo evento sembra essere dovuto ad una scarsa capacità del RE di riciclare lo ione, ciò causa una riduzione nella capacità di risposta cellulare come se nella cellula venisse indotta una condizione di standby con effetto anti-apoptotico. Pertanto questa prima fase è vista come un tentativo della cellula di rimediare al danno. La seconda fase è caratterizzata da un aumento della concentrazione di calcio nel RE e una diminuzione di quella citosolica che segna la "volontà" della cellula di

entrare in apoptosi. Ciò indica che un aumento della $[Ca^{2+}]_{RE}$ sensibilizza le cellule all'apoptosi e che quindi per partire, la morte cellulare programmata necessita di un serbatoio come il RE ricco di calcio che funga da donatore dello ione in caso di necessità di questo secondo messaggero. Il terzo segnale coincide con l'apoptosi ed è dato da una riduzione del calcio nel RE e un aumento della $[Ca^{2+}]_C$ probabilmente dovuto ad un collasso della calcio-ATPasi di membrana. Le cellule che hanno “deciso” di andare in apoptosi necessitano di un ulteriore input che trasformi questa propensione in un segnale molecolare di trasduzione dell'apoptosi (Fig. 20).

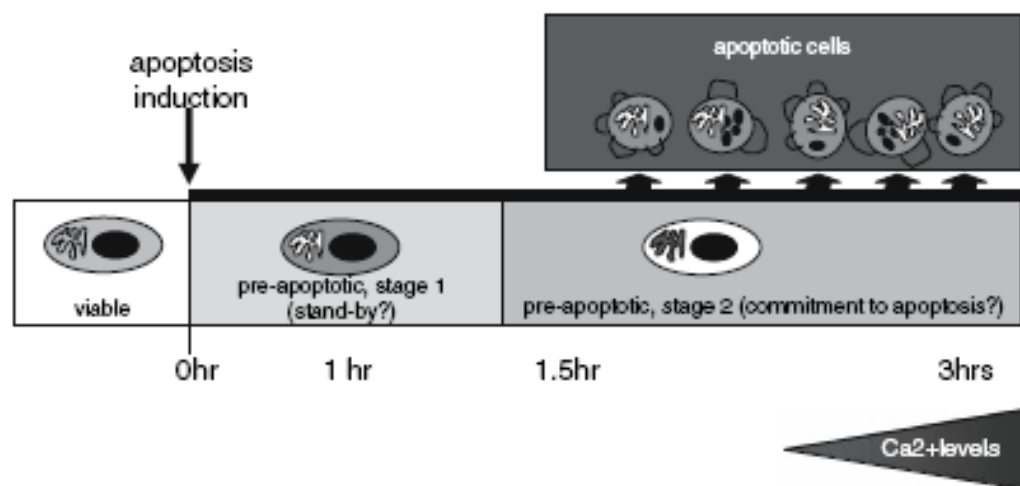


Figura 20: variazioni dello ione Ca^{2+} durante l'apoptosi indotta da fattori di stress (Cerella et al., 2007)

Dulon et al. (1991) documentano che anche il trattamento con il cisplatino induce un aumento della $[Ca^{2+}]_C$.

Pertanto una manipolazione del calcio intracellulare o l'utilizzo di molecole che interferiscono con questo ione (es. farmaci calcio antagonisti) possono rappresentare dei sistemi di controllo dell'apoptosi.

1.5.5 Il GAPDH

Tutti gli organismi sono esposti ad uno stress ossidativo ad opera dei ROS, sia durante il normale corso del metabolismo aerobico sia per esposizione ad agenti che generano radicali. Le specie reattive dell'ossigeno possono provocare svariati danni a carico delle macromolecole cellulari portando anche alla morte per apoptosi (Gutteridge & Halliwell, 2000; Curtin et al., 2002).

Le cellule per proteggersi da questi danni mettono in atto dei meccanismi di difesa che coinvolgono enzimi antiossidanti e scavenger dei radicali liberi (Temple et al., 2005).

In vari sistemi cellulari la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (Glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase=GAPDH) è considerata una molecola target, che funge da sensore in condizioni di stress ossidativi (Chuang et al., 2005). Il GAPDH è un enzima glicolitico che è espresso in tutti gli organismi sia procarioti sia eucarioti. Normalmente interviene nel processo di conversione della gliceraldeide-3-fosfato in 2,3-bisfosfoglicerato. La molecola è formata da quattro monomeri identici ognuno dei quali ha un sito catalitico con un residuo di cisteina (Sinover, 1999). La normale funzione del GAPDH è quella di intervenire nei meccanismi di generazione dell'energia cellulare, ma ci sono evidenze in merito ad un suo coinvolgimento in svariate attività indipendenti dalla glicolisi, tra le quali vi è l'apoptosi (Berry & Boulton, 2000; Hara et al., 2006).

Il suo ruolo nel processo apoptotico è stato inizialmente documentato nelle cellule cerebrali gangliari dove la morte cellulare programmata era associata con l'aumento dell'espressione di una proteina di 38kDa identificata poi con il GAPDH (Ishitani et al., 1998).

La localizzazione subcellulare e i livelli di espressione dell'enzima sono differenti per le linee non neuronali rispetto a quelle neuronali. Questa

molecola nella maggior parte di linee cellulari è normalmente presente a livello citosolico dove compie la sua attività glicolitica, mentre durante il processo apoptotico trasloca al nucleo. La sua localizzazione citoplasmatica è stata documentata in molte linee cellulari non sottoposte ad apoptosi tra le quali vi sono le COS-7 (Tajima et al., 1999), le S49, le PC12, le HEK- 293, le cellule epiteliali e le cellule cerebrali gangliari (Sawa et al., 1997; Ishitani et al., 1998; Shashidharan et al., 1999). In una linea cellulare di neuroblastoma (NB41A3) il GAPDH è stato documentato anche nel nucleo di cellule sane, 24h dopo l'induzione dell'apoptosi il livello di espressione dell'enzima nel nucleo aumentava. Ciò indica che la presenza di questa molecola nel nucleo non è un fattore di induzione dell'apoptosi, ma quello che lega il GAPDH alla morte cellulare programmata è la sua migrazione a livello nucleare (Dastoor & Dreyer, 2001).

Molte cellule nelle quali avviene la traslocazione del GAPDH nel nucleo non presentano i cambiamenti morfologici tipici dell'apoptosi, probabilmente perché questa migrazione è uno dei primi eventi che si hanno prima di raggiungere il punto di non ritorno oltre il quale la morte cellulare non può più essere fermata. Un ulteriore aumento dell'espressione del GAPDH, osservato nelle cellule in apoptosi, procede parallelamente alla frammentazione nucleare, anche se l'enzima non sembra dare legami con il DNA (Dastoor & Dreyer, 2001).

Anche durante lo stress ossidativo il livello di espressione del GAPDH aumenta (Dastoor & Dreyer, 2001). Questo enzima funge da molecola bersaglio per l'ossido nitrico (NO) formatosi in seguito ad uno stimolo apoptotico (Brune & Lapetina, 1996; Hara et al., 2006) e viene regolato da varie molecole, le protein chinasi C, l'EGF chinasi (Epidermal Growth Factor) e da protein chinasi II Ca^{2+} /calmodulina dipendente (Ashmarina et al., 1988; Reiss et al., 1996). La traslocazione a livello nucleare del GAPDH viene inibita dal Bcl-2 (Allen et al., 1998; Chao & Korsmeyer, 1998). Inoltre, Chen et al. (1999) mostrano che in cellule

indotte all'apoptosi con AraC si osserva un aumento dell'espressione del GAPDH a seguito dell'attivazione della p53. Una probabile funzione dell'enzima potrebbe essere quella di chaperonina che agisce come molecola pro-apoptotica a valle del Bcl-2 e della p53. La sua migrazione nel nucleo in combinazione con altri fattori può essere considerata come un evento chiave durante l'apoptosi (Dastoor & Dreyer, 2001).

1.6 UTILIZZO DI COLTURE CELLULARI PER STUDI DI TOSSICITA' E PROTEZIONE

Il meccanismo molecolare con il quale il cisplatino induce l'apoptosi sulle cellule uditive dell'ODC è studiato da molti anni e annovera svariate ipotesi che non hanno ancora chiarito completamente come esso agisca. Le ricerche sono state rese difficili dalla limitata disponibilità di tessuto nell'orecchio interno, dalla presenza di diversi tipi di cellule entro la coclea e dalle problematiche legate ai modelli di studio *in vivo* (Wu et al., 2001). Culture organotipiche della coclea permettono di mimare *in vitro* l'effetto che una sostanza ototossica può avere sull'animale *in vivo* ma, oltre alla difficoltà nell'estrazione di un organo estremamente piccolo, la richiesta di numerosi espianti per ogni replica sperimentale limitano l'utilizzo di questa tecnica.

Per ovviare a tutte le problematiche etiche e pratiche sono state create delle colture cellulari. Le cellule cigliate e i neuroni del ganglio spirale, già dal neonato sono in uno stadio differenziato terminale e quindi non in grado di proliferare né *in vivo* né *in vitro*. Queste limitazioni sono state superate dall'utilizzo di colture cellulari immortalizzate o derivate da topi transgenici (Immortomouse™) (Rivolta et al., 1998; Kalinec et al., 1999). In questa tesi, per studiare la tossicità e la protezione di alcune sostanze a carico dell'orecchio interno sono state utilizzate due linee cellulari, una linea epiteliale (OC-k3) l'altra neuronale (PC12).

1.6.1 Le OCK-3

Le OC-k3 sono una delle quattro linee cellulari ottenute da Kalinec et al. nel 1999. Queste cellule derivano dall'orecchio interno di topo immortalizzato, esse codificano per una proteina virale termosensibile, l'antigene-T (Tag) dell'SV40 (Simian Virus 40). Grazie alla proteina Tag sensibile alle variazioni di temperatura, quando le OC-k3 sono mantenute in condizioni permissive (temperatura di 33°C e terreno aggiunto con interferone- γ) esse hanno un aspetto fusiforme, hanno una elevata capacità replicativa e possono essere staccate e riseminate per almeno 50 volte senza perdere le loro caratteristiche (Fig. 21A). Quando, invece, vengono trasferite in condizioni non permissive (temperature di 39°C e assenza in interferone- γ) Tag viene denaturata e la proliferazione viene virtualmente sospesa, le cellule diminuiscono di numero e cambiano il loro aspetto morfologico (diventano simil-epiteliali) e il loro pattern di espressione proteica (Kalinec et al., 1999) (Fig 21B).

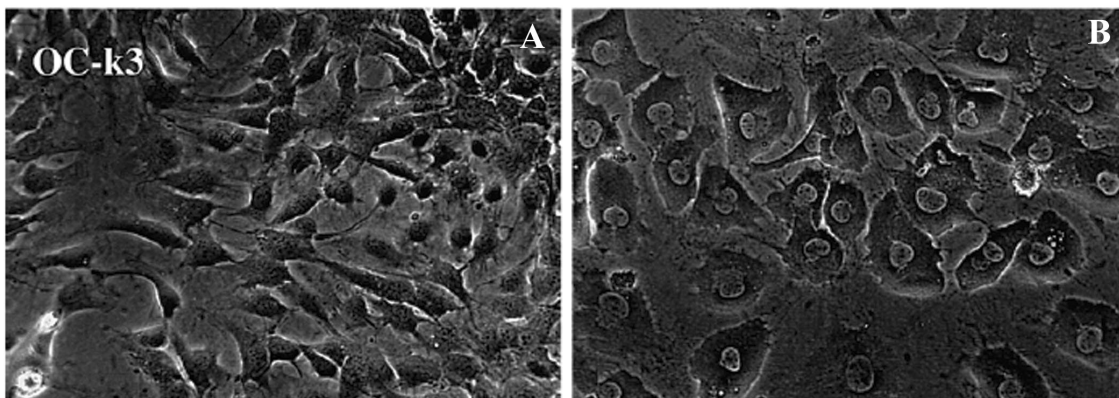


Figura 21: immagini di OC-k3 al microscopio a contrasto di fase. A) cellule con capacità replicativi, cresciute in condizioni permissive; B) cellule che hanno bloccato la proliferazione per spostamento in condizioni non permissive. (Kalinec et al., 1999).

Nelle quattro linee ottenute da Kalinec l'espressione proteica è differente ma tutti i cloni esprimono una proteina presente esclusivamente nell'orecchio interno, la OCP2 (Organ of Corti Protein 2). Le OC-k3 sono positive per la nestina (marker cellulare dei precursori neuroepiteliali)

inoltre, sono l'unica linea con caratteristiche epiteliali ben definite. Infatti, esprimono simultaneamente dei marker tipici delle cellule sensoriali uditive (come la miosina VIIa e il recettore α -9 dell'acetilcolina) e marker delle cellule di supporto (come la connessina 26), ma non esprimono quelli per cellule neuronali o gliali. Per questo motivo sono considerate un buon modello di studio *in vitro* delle cellule cigliate dell'ODC, infatti, sono state già da tempo utilizzate per studi sulla otossicità di farmaci quali la gentamicina e il cisplatino (Bertolaso et al., 2001, 2003; Previati et al., 2004, 2007).

Nel caso particolare del cis-DDP è dimostrato come nei confronti delle OC-k3 abbia un effetto apoptotico dose e tempo dipendente caratterizzato da frammentazione nucleare, integrità della membrana mitocondriale e assenza di attività endonucleasica del DNA, inoltre, causa la produzione di ROS intracellulari e una diminuzione del GSH probabilmente legato all'attivazione delle PKC (Bertolaso et al., 2001). Il meccanismo con il quale esso agisca non è ancora ampiamente chiarito.

1.6.2 Le PC12

Le linee cellulari che esprimono proprietà neuronali sono usate come modello per studiare il sistema nervoso nelle singole cellule e a livello molecolare. Alcune linee sono state ricavate dal neuroblastoma umano o murino (McMorris et al., 1973; Kolber et al., 1974) e da tumori del sistema nervoso centrale di ratto (Schubert et al., 1974).

Nel 1976 Greene & Tischler isolarono e stabilizzarono una linea cellulare di feocromocitoma di ratto (PC12), un tumore delle cellule cromaffini del surrene. Quando sono mantenute nel loro terreno di coltura hanno un forma rotonda o poligonale e tendono a crescer in gruppo. Le PC12 hanno numerose proprietà, crescono in adesione fino a 70 generazioni dal loro isolamento senza subire dei cambiamenti dal punto di vista genotipico e fenotipo (Fig. 22).

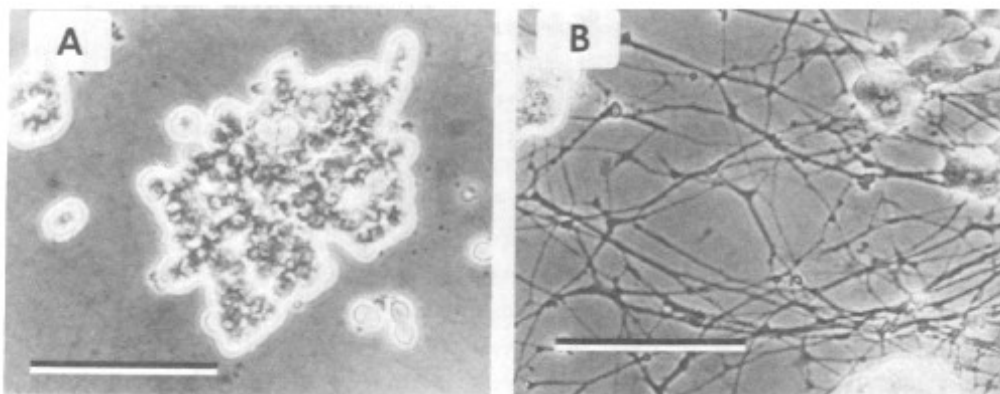


Figura 22: morfologia delle PC12 vista al microscopio a contrasto di fase. A) cellule indifferenziate ; B) cellule differenziate. (Scale bar=100 μ m). (Greene & Tischler, 1976).

Se vengono trattate con 50ng/ml di NGF (Nerve Growth Factor) le PC12 differenziano in cellule nervose, dopo sette giorni di esposizione al fattore di crescita la capacità replicativa si interrompe e cominciano a formarsi dei processi neuronali. Il numero, la lunghezza e la densità dei neuriti cresce nelle due settimane successive al trattamento. Dal punto di vista morfologico i neuroni formati sono simili a quelli delle colture primarie di neuroni simpatetici, emanano dei neuriti della lunghezza di 500-

1000µm e formano delle vescicole sinaptiche ed eccitabilità elettrica (Biales et al., 1976; Greene & Tischler, 1976; Tischler & Greene, 1978) (Fig. 22).

L'effetto dell'esposizione all'NGF è reversibile, in quanto se viene eliminato il fattore di crescita dal terreno, dopo 24h circa i $\frac{3}{4}$ della popolazione di PC12 differenziate perdono i neuriti ma non l'integrità del corpo cellulare. La capacità replicativa riprende dopo tre giorni dall'eliminazione dell'NGF, inoltre, se nuovamente esposte al fattore di crescita sono in grado di riformare i neuriti entro 24h (Greene & Tischler, 1976).

Dal punto di vista ultrastrutturale le PC12 contengono delle inclusioni dense di forma rotonda, ovoidale e a volte irregolare, della dimensione di 40-350nm; nel ratto queste inclusioni sono state documentate a livello delle cellule cromoaffini del surrene (Coupland, 1965a, 1965b).

Le PC12 sintetizzano e immagazzinano quantità apprezzabili di neurotrasmettitori, come la noraepinefrina e la dopamina, ma non l'epinefrina. Inoltre, possiedono canali del calcio di tipo N (Plummer et al., 1989) e di tipo T (Garber et al., 1989), e sono in grado di rilasciare vescicole esocitotiche in maniera calcio dipendente (Greene & Tischler, 1976).

Per tutte le loro caratteristiche sono considerate un buon modello di studio delle cellule neuronali e pertanto possono essere utilizzate per sperimentare l'effetto di sostanze ototossiche sui neuroni e sui loro precursori.

In letteratura sono presenti pochi lavori sull'effetto citossico di alcune sostanze sulle PC12 indifferenziate. Piga et al. (2005) dimostrano la tossicità di varie sostanze ossidanti, mentre l'unico lavoro che prende in considerazione il cisplatino è quello di Lee et al. (1998). Quest'ultimi documentano una tossicità dose-tempo dipendente del cis-DDP e ipotizzano che il pathway apoptotico implichi una regolazione del Bcl-2.

Al contrario, sono molto studiati gli effetti citossici di alcune sostanze sulle PC12 differenziate. L'effetto del cisplatino è ben documentato, e riguarda principalmente la induzione della riduzione o perdita dei neuriti (Klein et al., 2007).

1.7 PROTEZIONE DAI DANNI OTOTOSSICI INDOTTI DAL CISPLATINO

Da un punto di vista clinico sono utilizzabili tre differenti strategie per il trattamento protettivo durante la terapia con il cisplatino. La prima procedura prevede una protezione sistemica prima o dopo la somministrazione del chemioterapico, anch'esso per via sistemica. Questa strategia però può essere causa di una interazione tra i due farmaci che potrebbe o falsare l'azione del cisplatino oppure aumentarne gli effetti collaterali. Il secondo tipo di trattamento è locale, con iniezioni intraperitoneali di dosi elevate di cis-DDP e somministrazione intravenosa del protettore. Infine, il terzo trattamento è sistemico con il chemioterapico e locale per il protettore (Guastalla et al., 1994; Samant et al., 1999). Quest'ultimo metodo è considerato essere il migliore, anche se testato solo sperimentalmente, perché viene eliminato il problema della interazione sistemica e permette di avere una scelta più libera del tipo di sostanza da usare come protezione e dei tempi di somministrazione. Test svolti su animali mettono in evidenza come iniezioni locali del protettore a livello dell'orecchio medio possono ridurre l'ototossicità indotta dal cis-DDP (Li et al., 2001b).

Il cisplatino induce ototossicità portando alla morte cellulare per apoptosi, sia agendo sul DNA, sia inducendo la produzione di radicali liberi entro la cellula, sia attraverso l'aumento della concentrazione delle ione Ca^{2+} a livello citoplasmatico. Pertanto le sostanze da utilizzare come protettori dovrebbero essere in grado di penetrare nell'orecchio interno. L'effetto protettivo dovrebbe essere esercitato attraverso il sostegno del sistema antiossidante, bloccando l'aumento del calcio intracellulare o interferendo in un qualche modo a uno o più livelli nella via di induzione del processo apoptotico.

1.7.1 Il *Ginkgo biloba*

Una delle vie con cui si esplica l'azione ototossica del cisplatino è, come detto in precedenza, attraverso l'induzione della produzione di ROS entro le cellule uditive, riducendo gli antiossidanti e inducendo le cellule alla morte per apoptosi. L'utilizzo di sostanze antiossidanti nella prevenzione del danno uditivo indotto dal cis-DDP è oggetto di molti studi. In modelli animali, come il ratto e la cavia sono stati somministrati a livello locale degli agenti antiossidanti come la D- o la L-metionina (Ekborn et al., 2002; Li et al., 2002), il trolox (Teranishi & Nakashima, 2003) e la tiourea (Ekborn et al., 2003) che sono in grado di proteggere l'ODC dalla perdita delle cellule cigliae esterne e/o della acutezza uditiva indotta dal cisplatino. La L-N-acetilcisteina dimostra una buona capacità protettiva anche sui neuroni uditivi (Feghali et al., 2001).

Da diversi anni tra questa moltitudine di composti ad effetto antiossidante si è fatta strada una sostanza utilizzata da più di 5000 anni nella medicina tradizionale cinese, l'estratto vegetale di *Ginkgo biloba*. La prima pubblicazione riguardo l'utilizzo dell'albero del ginkgo per scopi medici risale la 1505 A. C. in un testo di Liu Weh-Tai & Ben Cao Pin Hue Jing Yaor (De Feudis & Drieu, 2000).

Il *G. biloba* è un albero considerato un fossile vivente esistente da più di 200 milioni di anni. L'estratto delle foglie di questa pianta è preparato in modo rigoroso e standardizzato ed è chiamato "EGb 761" esso contiene il 24% di flavonoidi, il 6% di terpenoidi (ginkgolidi A, B, C, J e bilobalide), il 5-10% di acidi organici e meno dello 0,5% di pro-antocianidine (Drieu, 1986; De Feudis & Drieu, 2000; Katzung, 2006).

L'estratto delle foglie del *G. biloba* è ampiamente usato nella fitomedicina europea per curare numerose malattie e disfunzioni come quelle cardiache, quelle vascolari e degli arti inferiori, le allergie, i primi sintomi dell'Alzheimer, della demenza vascolare, disturbi dell'udito e il tinnito di origine vascolare (Sierpina et al., 2003; Smith et al., 2005; Hilton

& Stuart, 2009). Una delle proprietà più importanti di questo estratto è quella antiossidante, esso ha la funzione di scavenger dei radicali liberi. Infatti, è documentata la sua capacità di proteggere il cervello e il sistema nervoso (oltre che altri tessuti e organi) dai danni causati dai ROS e di conseguenza dall'apoptosi. (Bastianetto et al. 2000a, 2000b, MacLennan et al., 2002; Smith & Luo, 2004; Wang et al., 2006).

La maggior parte degli studi sperimentali svolti su animali o su colture cellulari sono principalmente incentrati sull'effetto antiossidante dell'EGb 761 sui neuroni sottoposti a vari tipi di stress, e sono per lo più legati allo studio di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer (Bastianetto et al., 2000a, 2000b; Guidetti et al., 2001; MacLennan et al., 2002; Massieu et al., 2004; Smith & Luo, 2004; Kang et al., 2007). Solo Öztürk et al. (2004) documentano la capacità protettiva dell'EGb 761 nei confronti dell'azione neurotossica del cisplatino.

I lavori che si occupano dell'utilizzo dell'estratto del *G. biloba* nella prevenzione di patologie a carico dell'orecchio interno riguardano principalmente il suo utilizzo nel trattamento clinico dei disturbi vestibolari come la malattia di Ménière, le neuropatie vestibolari, le vertigini e il differenziamento del nervo vestibolare (Darlington et al., 1997; Diamond et al., 2000). Per quanto riguarda il danno ototossico indotto dal cisplatino ci sono alcuni lavori *in vivo* che dimostrano che il EGb 761 ha una azione protettiva, sia riducendo la perdita uditiva, sia preservando l'organo del Corti dalla morte delle cellule cigliate esterne (Fukaya & Yashuta, 1998; Xu et al., 2004; Huang et al., 2007). L'unico dato in merito all'utilizzo dell'estratto vegetale come protettore nei confronti dell'azione ototossica del cisplatino *in vitro* è stato pubblicato da Astolfi et al. (2008).

1.7.2 La Flunarizina

Il calcio ha un ruolo importante nell'orecchio interno, regola la funzionalità delle cellule cigliate, in quanto è coinvolto sia nella trasduzione meccanica dell'impulso all'apice cellulare sia nel rilascio dei neurotrasmettitori alla base (Blanchet et al., 1996; Dulon et al., 1998; Yamoah et al., 1998). Inoltre, è importante anche per la funzionalità neuronale, in quanto un aumento della concentrazione di calcio a livello citoplasmatico ($[Ca^{2+}]_C$) indotto da vari insulti è la causa maggiore di morte neuronale per apoptosi o necrosi (Choi, 1988; Meldrum & Garthwaite, 1990; Nicotera et al., 1992; Lipton & Rosenberg, 1994; Dowd, 1995; Trump & Berezsky, 1995).

Il trattamento con il cisplatino induce anche un aumento $[Ca^{2+}]_C$ (Dulon et al., 1991) che è anch'esso correlato con il processo apoptotico (Rizzuto et al., 2003; Cerella et al., 2007). Pertanto uno dei possibili sistemi per bloccare o prevenire l'apoptosi potrebbe essere quello di utilizzare delle sostanze in grado di interagire con questo ione o bloccarne l'entrata e l'uscita nella cellula.

La flunarizina ((E)-1-[bis(4-fluorophenyl)methyl]-4-(3-phenyl-2-propenyl) piperazine) è un derivato della piperazina e appartiene al gruppo dei farmaci bloccanti del calcio o calcio antagonisti (Van Nueten & Vanhoutte, 1984) (Fig. 23).

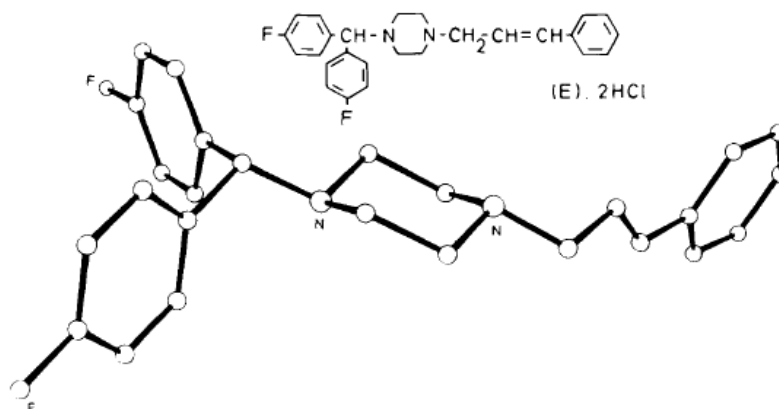


Figura 23: struttura chimica e tridimensionale della flunarizina (Van Nueten & Vanhoutte, 1984).

Questo farmaco è in grado di agire sui canali voltaggio dipendenti di tipo-T (CACN α 1G e CACN α 1I) e di tipo-L, i quali permettono l'entrata del calcio entro la cellula, ma la flunarizina è anche in grado di bloccare l'attività dell'istamina H1 (Santi et al., 2002; Katzung, 2006). In generale i farmaci calcio antagonisti agiscono sulla parte interna della membrana plasmatica legandosi in maniera più efficace ai canali delle membrane depolarizzante, diminuendo la loro frequenza di apertura in risposta alla depolarizzazione. Questo comporta un calo della corrente di calcio entrante. I tessuti nei quali questo tipo di canali svolgono un ruolo predominante (es. i neuroni e le principali ghiandole secretorie) sono meno influenzati dai farmaci calcio antagonisti rispetto alla muscolatura cardiaca e liscia. Quindi la funzionalità dei neuroni non viene alterata a meno che questi farmaci non siano utilizzati in dosi massicce (Katzung, 2006).

Clinicamente la flunarizina è stata ampiamente utilizzata per trattare la malattia di Meenièrè (Thai-Van et al., 2001) le vertigini (Olesen et al., 1988) le emicranie (Spierings, 1998; Katzung, 2006), l'epilessia (Greenberg et al., 1987), il tinnito (Murai et al., 1992) e anche come agente neuroprotettivo nei trattamenti di malattie post-cerebrovascolari, infarti cerebrali e emorragie cerebrali (Kuroki et al., 1996). Normalmente la flunarizina è ben tollerata ma dati clinici riportano casi di depressione o sintomi extrapiramidali legati a trattamenti cronici con questo farmaco (Chouza et al. 1986; Brücke et al. 1995).

A livello sperimentale l'effetto protettivo della flunarizina è stato largamente studiato soprattutto a livello neuronale, sia *in vivo* in diverse specie di mammiferi, sia *in vitro*, su varie linee cellulari tra le quali troviamo le PC12 differenziate e i DRG (dorsal root ganglion). Questi lavori riguardano in particolare l'effetto protettivo nei confronti dell'eliminazione del siero (Schierle & Brundin, 1999) o dell'NGF (Eichler et al., 1994; Dyspersin et al., 1999) e degli stress ossidativi (Goncalves et al., 1999).

Al contrario poche ricerche sono state indirizzate allo studio della flunarizina come protettore del danno indotto dal cisplatino sulle cellule cigliate dell'ODC (So et al, 2005, 2006, 2008), e soprattutto nessun lavoro è stato effettuato sulla otoprotezione dal cisplatino a livello neuronale.

Molte sono le ipotesi sul meccanismo con il quale la flunarizina espliciti la sua azione protettiva. Molti autori affermano che oltre a bloccare i canali del calcio essa è altresì in grado di bloccare l'entrata di ioni Na^+ con diminuzione della depolarizzazione dei neuroni (Pauwels et al., 1999), altri affermano che è in grado di inibire la perossidazione lipidica (Elimadi et al., 1998; Takei et al., 1994; So et al., 2004) e la formazione di megacanaloni sulla membrana mitocondriale. Rich & Hollowell (1990) documentano che la flunarizina, essendo una molecola lipofila, si concentra a livello delle membrane dei mitocondri prevenendo l'accumulo di calcio e il deterioramento del processo di sintesi dell'ATP. Inoltre, è studiata la capacità di questo farmaco di interagire con le membrane fosfolipidiche inibendo il rilascio del calcio ad opera del PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) (Seiler et al., 1987) e prevenendo la riorganizzazione lipidica della membrana plasmatica agendo sulla transizione di fase della PS (Vogelgesang et al., 1988; Thomas & Verkleij, 1990; Vogelgesang & Scheuffler, 1990; Eichler et al. 1994).

La capacità d'azione multipla della flunarizina suggerisce che questa molecola è in grado di interferire in diversi stadi, sia dell'apoptosi sia della necrosi (Takei et al., 1994; Elimadi et al., 1998)

1.8 SCOPO DELLA TESI

L'ototossicità indotta dal cisplatino è da tempo oggetto di molti studi, in quanto il meccanismo con il quale agisce questo chemioterapico non è ancora ben definito. La perdita uditiva indotta dal cisplatino comporta la morte per apoptosi delle cellule uditive (sia epiteliali sia neuronali) che a causa della loro incapacità rigenerativa, una volta perse non possono essere più sostituite. Pertanto, risulta di grande interesse trovare molecole in grado di proteggere l'orecchio interno da questi danni.

Lo scopo di questa tesi è appunto quello di testare due sostanze, l'estratto vegetale di *Ginkgo biloba* (ginkgoselect) e la flunarizina rispettivamente sulle OC-k3 e sulle PC12 trattate con cisplatino.

La scelta del ginkgo come sostanza protettiva è dovuta alle sue ben conosciute proprietà antiossidanti utili per contrastare la capacità del cisplatino di indurre la produzione dei ROS e la riduzione degli antiossidanti cellulari. Questo composto è stato testato sulle OC-k3 in quanto queste cellule ci permettono di mimare quello che accade a livello delle cellule cigliate dell'organo del Corti. In letteratura sono riportati dati positivi in merito a studi di otoprotezione *in vivo* con *G. biloba* su animali esposti al cis-DDP ma non ci sono molti dati su studi *in vitro*. Quindi è stata in primis valutata la tossicità del cisplatino e quella eventuale del ginkgoselect, per poi verificare se quest'ultimo era protettivo nei confronti del chemioterapico.

In parallelo è stata testata la flunarizina, un farmaco bloccante del calcio, per verificare se con queste sue proprietà è in grado di bloccare l'apoptosi indotta dal cisplatino. In letteratura sono riportati dati in merito all'otoprotezione della flunarizina sulle cellule cigliate ma non ce ne sono relativi alla componente neuronale dell'organo del Corti. Per questo motivo sono state scelte le PC12, su queste cellule sono stati svolti test di tossicità

e di protezione in primis sulle cellule indifferenziate con l'obbiettivo di svolgere una indagine di base per poi eseguire le stesse prove in modo mirato sulle stesse cellule differenziate in neuroni. Quindi è stata d'apprima valutata la tossicità dei due farmaci e in seguito è stato indagato il pathway di espressione di alcune proteine coinvolte nel processo apoptotico per capire in che modo la flunarizina possa agire nei confronti del cis-DDP. Sulla base dei dati raccolti sulle PC12 indifferenziate sono stati svolti tests di tossicità e di protezione anche sulle PC12 indifferenziate.

Gli esperimenti svolti in questa tesi serviranno come punto di partenza per ampliare le nostre conoscenze sui meccanismi d'azione del cisplatino e per potere in futuro svolgere ricerche in modo sempre più mirato sia sulle cellule cigliate sia sui neuroni del ganglio spirale e di sperimentare sistemi di protezione dal danno ototossico.

2 MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE CELLULARI

2.1.1 Le OCK3

Le Ock-3 sono state coltivate in adesione in condizioni permissive di 33°C e 10% di CO₂, in terreno completo costituito da:

- DMEM (Dulbecco Modified Eagles's Medium; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.);
- 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco BRL);
- 1% L-Glutammina (Gibco BRL);
- 50U/ml di interferone γ (IFN, Genzyme, Cambridge, MA, U.S.A.).

Per il mantenimento della coltura cellulare il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni, e le cellule a confluenza sono state staccate con Tripsina EDTA 0,25% (Gibco, BRL) a 37°C per 1min.

2.1.2 Le PC12 indifferenziate

Le PC12 sono state coltivate e mantenute in adesione a 37°C e 5% di CO₂, in terreno di coltura completo composto da:

- DMEM;
- 10% FBS;
- 5% HS (Horse Serum; Gibco BRL);
- 1% PS (Penicillina-Streptomicina, Gibco BRL);
- 1% L-Glutammina 2mM.

Il terreno è stato rinnovato ogni due giorni; le cellule sono state staccate con Tripsina EDTA a 37°C per 30 secondi.

2.1.3 Le PC12 differenziate

Dopo aver lasciato aderire le PC12 in terreno completo per 24h, è stato completamente sostituito il terreno con quello incompleto così composto:

- DMEM ;
- 1% FBS;
- 0,5% HS ;
- 1% PS ;
- 1% L-Glutammina;
- 50ng/ml di NGF (Nerve Growth Factor-SIGMA).

Ogni 2 giorni parte del terreno è stato sostituito con terreno incompleto pulito. Dopo 6 giorni le cellule erano differenziate e quindi pronte per essere trattate.

2.2 PROVE DI TOSSICITA' E DI PROTEZIONE

Sia sulle OC-k3 e sia sulle PC12 i test tossicologici con il cisplatino sono stati eseguiti utilizzando una soluzione madre di Cisplatino Mayne Pharma Italy di 100mg/100ml.

In tutte le prove di seguito descritte sono stati preparati dei campioni di controllo che consistevano in cellule non trattate. Inoltre, tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte e ogni volta tutti i campioni sono stati preparati e trattati in triplicato.

2.2.1 Esperimenti svolti sulle OCK3

Sulle OC-k3 è stata testata la tossicità delle seguenti sostanze, aggiunte direttamente al terreno di coltura:

- il cisplatino somministrato alle seguenti concentrazioni 5-13-50-100-200-300 μ M per tempi variabili dalle 24h alle 48h.
- l'estratto vegetale di *Ginkgo biloba* (Ginkgoselect®, Phytosome®-Indena), utilizzato alle concentrazioni di 6,25-12,5-25-50-100-150-200-300 μ g/ml, partendo da una soluzione madre di 40mg/ml di ginkgoselect disciolto in 50% di DMSO (dimetilsolfossido, SIGMA) e 50% di acqua.

In seguito sono state eseguite prove di protezione che consistevano nel pretrattare le cellule con il ginkgoselect e dopo 2h o 24h aggiungere il cisplatino al terreno. Sono state, inoltre, eseguiti test nei quali dopo il pretrattamento tutto il terreno veniva sostituito con terreno nuovo mancante di ginkgoselect e in seguito veniva aggiunto il cisplatino. In queste prove di protezione è stata anche valutata l'eventuale tossicità del DMSO. Nelle varie analisi la concentrazione del dimetilsolfossido non superava mai lo 0,5% che è limite massimo consentito di solvente organico utilizzabile per non danneggiare le cellule.

Sia per i test di tossicità sia per quelli di protezione sono state valutate:

- 1) la vitalità cellulare con le conte cellulari e l'utilizzo del citofluorimetro;
- 2) il processo apoptotico sia con la tecnica del DNA ladder sia con il kit per l'annexina sia valutando gli aspetti morfologici con la colorazione DAPI e Falloidina.

2.2.2 Esperimenti eseguiti sulle PC12 indifferenziate

Per quanto riguarda le PC12 indifferenziate oltre al cisplatino testato alle concentrazioni utilizzate sulle OC-k3 e per tempi che andavano dalle 24h alle 72h è stata valutata anche la tossicità della Flunarizina (SIGMA) alle concentrazioni 1-5-10-20-30 μ M. La soluzione madre con concentrazione pari a 6mM è stata preparata solubilizzando il farmaco in DMSO e acqua (1:1).

Nelle prove di protezione le cellule sono state pre-trattate con flunarizina per 30 minuti e allo scadere del tempo è stata aggiunto il cisplatino. Anche in questo caso è stata valutata anche l'eventuale tossicità del DMSO che nelle diverse prove non superava mai lo 0,5% del volume finale.

Sulle PC12 trattate con cisplatino o con flunarizina e sulle prove di protezione sono state eseguite le seguenti indagini:

- 1) analisi della vitalità cellulare con le conte cellulari e l'utilizzo di saggi colorimetrici;
- 2) studio del processo apoptotico con la tecnica del DNA ladder, con il kit per l'annexina, valutando gli aspetti morfologici con la colorazione DAPI e falloidina;
- 3) studio del pathway apoptotico con il wester blott e l'immunocitochimica.

2.2.3 Esperimenti svolti sulle PC12 differenziate

Sulle PC12 differenziate i test sono stati eseguiti solo dopo 6 giorni di trattamento con NGF. Le prove di tossicità sono state eseguite con cisplatino 5-13-50 μ M, e con flunarizina 1-5-10-20 μ M, inoltre, sono stati eseguiti dei test di co-trattamento, pre-trattando con flunarizina per 30 minuti e aggiungendo in seguito il cisplatino. Gli esperimenti sono stati eseguiti senza eliminare l'NGF dal terreno e per un tempo massimo di 24h.

Le analisi svolte sono state i test di vitalità con saggio colorimetrico e analisi morfologica con DAPI e Falloidina.

Tutte le analisi elencate nei paragrafi precedenti verranno spiegate in dettaglio di seguito

2.4 STUDIO DELLA VITALITA' CELLULARE

2.4.1 Conte cellulari

Questo tipo di tecnica consiste nel conteggio manuale del numero di cellule vive per ogni campione, ed è stata utilizzata per effettuare uno screening iniziale sulla tossicità delle sostanze in esame.

Le cellule (OC-k3 e PC12 indifferenziate) sono state seminate su piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 100.000 cellule/ml; venivano lasciate aderire al fondo e dopo 24h si trattavano secondo le modalità descritte precedentemente per ogni linea cellulare.

Allo scadere dei tempi di trattamento (al massimo 72h), da ogni pozzetto venivano staccate le cellule e si prelevano due aliquote da 10 μ l sulle quali è stato eseguito il conteggio del numero di cellule vive nel campione utilizzando la camera di Burker al microscopio a contrasto di fase (Nikon Eclipse TS100) con ingrandimento 10X.

Da ogni campione sono state eseguite 8 letture (una per ogni quadrante di cui è composta la camera). Dai dati raccolti è stata ricavata la media. Il valore medio è stato moltiplicato per il fattore di diluizione di 10⁴ per ottenere il numero medio di cellule vive per ml di campione.

Questo dato è stato graficato e sottoposto ad analisi statistica.

2.4.2 Saggio colorimetrico

Questo tipo di esame permette di valutare la vitalità cellulare aggiungendo direttamente al terreno di coltura un sale ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt= MTS) che viene convertito dalle cellule vitali in un composto colorato e solubile nel terreno di coltura, il formazano. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vive. Questa

metodica è veloce e ci ha permesso di eliminare problemi relativi al distacco delle cellule dal pozzetto, al rischio di perdere del campione e, inoltre, essendo la lettura effettuata da uno strumento veniva ridotto l'errore.

Questo test è stato svolto sia sulle PC12 indifferenziate per verificare i dati dei conteggi, sia sulle PC12 differenziate per le quali le altre metodiche per lo studio della vitalità sono risultate non adeguate.

Le cellule dopo essere state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 1000-5000 cellule/100µl/pozzetto, sono state lasciate aderire per 24h dopo di che si è proceduto al trattamento come specificato precedentemente. Nel caso delle PC12 differenziate le cellule sono state trattate dopo i 6 giorni di differenziamento. Scaduto il tempo di trattamento ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 20µl di una miscela composta da MTS (CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder, Promega) e PMS (Sigma) in rapporto 20:1. Dopo 4h di incubazione a 37°C, è stata effettuata una lettura a 492nm con il lettore di piastre (SIRIO, SEAC S. R. L., Firenze).

Il valore di assorbanza ottenuto per ogni campione, espresso come densità ottica (OD= optical density), è stato analizzato e sottoposto a indagine statistica.

2.4.3 Citofluorimetro

Il citofluorimetro a flusso è uno strumento che ci ha permesso di svolgere indagini sulla vitalità e sulla mortalità cellulare esaminando un numero di eventi di molto superiore (dai 10.000 eventi in su) rispetto alle tecniche fin qui descritte. Quindi ci ha fornito dei dati più attendibili e precisi.

Questa tecnica è ideale per l'analisi di cellule che vivono in sospensione, ma con qualche accorgimento si riescono ad ottenere buoni risultati anche con quelle in adesione, molto importante è che una volta distaccate, per favorire la separazione delle singole cellule occorre

mescolare bene la sospensione cellulare durante i vari passaggi dell'analisi. Con le OC-k3 non sono stati riscontrati problemi nell'utilizzo di questa metodica, mentre con le PC12 indifferenziate e differenziate in neuroni sono sorte grosse difficoltà. Le prime tendevano a rimanere troppo aggregate anche una volta distaccate dalla fiasca, per le seconde il distacco causava dei traumi che falsavano la lettura. Pertanto questa tecnica è stata utilizzata solo sulle OC-k3.

I campioni sono stati preparati seminando le cellule in piastre da 6 pozzetti alla concentrazione di 150.000 cellule/pozzetto. Dopo 24h sono state trattate come descritto per le singole linee cellulari. Per ogni esperimento sono stati anche preparati dei pozzetti contenenti cellule non trattate che sono state utilizzate per settare lo strumento come verrà spiegato di seguito.

Al termine del trattamento (24h e/o 48h) le cellule sono state staccate con Tripsina EDTA (30 secondi a 37°C) e in seguito, la sua azione disgregante veniva bloccata riutilizzando il terreno prelevato precedentemente dai corrispettivi pozzetti, in modo da non eliminare le eventuali cellule che erano finite in sospensione a causa del trattamento. Le cellule staccate sono state raccolte e posizionate negli appositi tubi per l'analisi citofluorimetrica e mantenuti in ghiaccio.

Ai campioni è stato aggiunto ioduro di propidio (PI, SIGMA) alla concentrazione finale di 2µg/ml, per circa 10 minuti al buio, poi è stata eseguita l'analisi al citofluorimetro (FACS-Calibur, Becton Dickinson) valutando come parametri la SSC/FSC (side scatter/ forward scatter) e la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con il PI (FL2-H). Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA, normalmente le cellule vive, che hanno quindi le pompe di membrana intatte, sono in grado di espellerlo; quando la cellula viene danneggiata o muore non riuscendo più a eliminare il PI lo incorpora nel nucleo, grazie a questo fenomeno è possibile distinguere le cellule vive da quelle morte.

Lo strumento è stato settato utilizzando un campione non trattato tale e quale come controllo negativo, chiamato BIANCO, ed un secondo al quale è stato aggiunto aggiunto lo 0,1% di NP40 (SIGMA) e 2 μ g/ml di PI, quest'ultimo campione costituisca un controllo positivo per la fluorescenza, in quanto NP40 è un detergente che uccide tutte le cellule e il PI colora solo i nuclei delle cellule morte.

Per ogni campione sono state calcolate, la percentuale di cellule vive e quella di cellule morte con il programma Cell Quest Pro (Becton Dickinson), questi dati sono stati sottoposti ad analisi statistica e la mortalità è stata graficata.

2.6 STUDIO DELL'APOPTOSI

2.6.1 Analisi morfologia dell'apoptosi con annessina-V

Per documentare se le cellule trattate con cisplatino andavano in contro ad apoptosi, a quali concentrazioni questo processo aveva inizio e se le sostanze protettive erano in grado di rallentare o bloccare la morte cellulare programmata è stato utilizzato il Kit con l'Annessina V (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, abcam). Questa molecola è in grado di legare la fosfatidilserina (PS) esposta sulla membrana citoplasmatica delle cellule in apoptosi colorandole in verde. Assieme all'annessina è stato utilizzato il PI che colorava in rosso i nuclei delle cellule morte o di quelle che avevano la membrana cellulare alterata e non erano pertanto più in grado di espellere il colorante. Quindi le cellule in apoptosi si coloravano in verde nelle fasi iniziali del processo e anche in rosso durante l'avanzamento dell'apoptosis, mentre quelle in necrosi presentavano solo i nuclei rossi .

I campioni sono stati preparati seminando in piastre da 6 pozzetti 80.000 cellule/pozzetto facendole aderire su vetrino coprioggetto. Per favorire l'adesione le cellule sono state lasciate aderire per un giorno e in seguito sono state trattate come indicato per le varie linee cellulari, per 24h e/o 48h.

Allo scadere del tempo di trattamento veniva raccolto il per una eventuale analisi della sospensione, alle cellule su vetrino invece è stato aggiunto il tampone completo di PI e annessina-V. Dopo 5 minuti, durante i quali il campione è stato mantenuto al buio, ogni vetrino veniva posizionato su un vetrino portaoggetto e osservato al microscopio ottico a fluorescenza. L'analisi delle cellule rimaste in sospensione è stata eseguita solo sulle PC12 indifferenziate, il surnatante è stato centrifugato a 1000rpm per 5 minuti, il pellet con le cellule è stato in seguito trattato come visto in precedenza per quelle in adesione. Un'aliquota da 50µl è stata posta su un

vetrino porta oggetto, chiuso con il coprioggetto e anch'esso osservato al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse TE2000-U).

2.6.2 Analisi morfologica con falloidina e dapi

Con questo tipo di analisi è stato indagato lo stato del citoscheletro e del nucleo, per valutare se i vari trattamenti causavano delle alterazioni morfologiche alle cellule. Questa metodica è stata eseguita su tutte le linee cellulari oggetto di questo studio.

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 100.000 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti entro i quali erano stati messi dei vetrini coprioggetto precedentemente lavati con alcool. Dopo 24h sono stati eseguiti i trattamenti. Per le PC12 differenziate è stato seminato un numero massimo di 50.000 cellule/pozzetto anch'esse su vetrino, e dopo 24h è stato indotto il differenziamento, protratto per 6 giorni a cui è seguito il trattamento. Allo scadere delle 24h e/o 48h di trattamento e/o co-trattamento le cellule sono state fissate per 30 minuti in paraformaldeide 4% (PFA, SIGMA), le PC12 differenziate invece sono state fissate solo per 10 minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con PBS 1X (Gibco, BRL). La prima colorazione è stata effettuata con Falloidina-TRITC (SIGMA) alla concentrazione di 100ng/ml per 2h per colorare il citoscheletro. Dopo un lavaggio in PBS 1X è seguita la seconda colorazione con DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindole) (SIGMA) alla concentrazione di 1,09 µg/ml per 20 minuti per colorare i nuclei. In seguito i vetrini sono stati montati su vetrino portaoggetto con Glicerolo (SIGMA) al 20% e osservati al microscopio ottico a fluorescenza.

2.6.3 Studio della fase tardiva con il DNA ladder

Con il DNA ladder è possibile documentare la fase tardiva dell'apoptosi durante la quale viene frammentato il DNA nucleare. Pertanto ci è servita

per verificare se il cisplatino induceva la frammentazione del nucleo alle varie concentrazioni testate.

Le OC-k3 e le PC12 indifferenziate sono state seminate e trattate con le medesime modalità viste in precedenza per la vitalità al citofluorimetro, i campioni dopo un massimo di 72h dal trattamento o co-trattamento sono stati raccolti, lavati con PBS 1X e centrifugati a 1000rpm per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in 0,5ml di buffer di lisi a pH=8, composto da:

- 1% SDS (sodio dodecil solfato, SIGMA);
- Tris-HCl 100mM (SIGMA);
- EDTA 25mM (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, SIGMA);
- NaCl 100mM (SIGMA);
- 1mg/ml di proteinasi K (SIGMA);

Il tutto è stato incubato overnight at 50°C. Il giorno successivo i campioni sono stati trattati con 10mg/ml di RNAasi-A (ribonucleasi-A, SIGMA) per 2h a 37°C. Il DNA genomico è stato quindi estratto da ciascun campione seguendo il protocollo del QIAamp Blood Extraction Kit (Qiagen, Milan, Italy) e risospeso in 100µl di acqua DNAsi e RNAsi free. Infine, il prodotto di estrazione è stato risolto su gel di agarosio.

La dimensione dei frammenti è stata controllata mediante confronto con lo standard di DNA a peso molecolare noto (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany).

Le foto dei gel sono state eseguite mediante lo strumento Gel Doc XR system (Bio-Rad, Milan, Italy).

2.6.4 Valutazione dell'espressione proteica

Lo studio delle proteine coinvolte nel processo apoptotico è stato eseguito solo sulle PC12 indifferenziate e con due tipi di metodiche, una che ci ha permesso di valutare queste proteine dal punto di vista quantitativo (Western blot) e l'altra dal punto di vista qualitativo (Immunocitochimica).

2.6.4.1 Western Blot

Le PC12 sono state seminate su piastre petri di 10cm di diametro alla concentrazione di 10^6 cellule e lasciate crescere quasi a confluenza; in seguito sono state trattate con cispaltino $13\mu\text{M}$, o con flunarizina $10\mu\text{M}$ o con entrambe (pre-trattando con flunarizina per 30 minuti). I tempi di somministrazione delle sostanze in esame erano di 5''-15''-30''-1'-5'-15'-30'-45'-1h-2h-3h-24h-48h-72h. Un campione di controllo è stato mantenuto non trattato.

Allo scadere dei tempi di trattamento le cellule sono state staccate con tripsina EDTA e bloccate con il loro terreno precedentemente conservato. La sospensione cellulare è stata centrifugata a 1.000rpm per 10 minuti, ed è stato mantenuto solo il pellet il quale veniva risospeso e lavato con PBS 1X e nuovamente centrifugato. Il surnatante è stato eliminato e al pellet veniva aggiunto il buffer per lisare le cellule (Lysis Buffer) completo degli inibitori delle proteasi. Dopo 15 minuti a 4°C i campioni sono stati centrifugati a 13.000rpm per 15 minuti a 4°C ed è stato recuperato il surnatante.

Le proteine presenti nel lisato cellulare venivano quantificate con il BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Il test è stato eseguito su piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, e la lettura veniva eseguita a 562nm.

La curva di taratura è stata determinata con BSA (Albumin from bovine serum) fornita nel kit ed utilizzata a quantità note ($1\mu\text{g}$, $2\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$, $10\mu\text{g}$, $25\mu\text{g}$ e $50\mu\text{g}$).

Per ogni campione sono state preparate delle aliquote alla concentrazione di 30µg di proteine per 20µl alle quali veniva aggiunto il Lane Marker Sample buffer SML 5X (Celbio). I campioni sono stati bolliti per 3-5 minuti, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, infine sono stati caricati e risolti in gel di acrilammide (Stacking 4%; Running 10-12,5% in funzione della dimensione delle proteine da analizzare).

Come riferimento è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare ColorBurst™ Electrophoresis Marker (SIGMA).

La corsa elettroforetica è stata svolta con un sistema di elettroforesi verticale maxigel PerfectBlue™ (PEQLAB, Biotechnologie GmbH) a corrente costante.

Le proteine separate su gel venivano trasferite su di una membrana di PVDF (Hydrophobic polyvinylidene difluoride, Amersham Hybond™-P, Biosciences, GE) con l'apparecchiatura Semi-Dry Elektrobloetter PerfectBlue (PEQLAB, Biotechnologie GmbH) a corrente costante per massimo 2h.

Per l'immunorivelazione la membrana, previa attivazione in metanolo, è stata incubata con soluzione di saturazione al 5% di latte in TBST 1x (TBS + 0.05% di Tween 20, SIGMA), per 30 minuti a temperatura ambiente (T. A.) in agitazione.

Successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi con TBST 1X per almeno 5 minuti l'uno a T.A. in agitazione.

L'anticorpo primario AbI (Santa Cruz) è stato diluito nella soluzione di saturazione al 3% di latte in TBST 1X, le concentrazioni e i tempi di incubazione sono riportati in Tabella 1.

Dopo tre lavaggi da 5 minuti in TBST 1X la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi AbII-HRP (SIGMA) diluito in soluzione di saturazione al 5% di latte in TBST 1X. Per concentrazioni e tempi di incubazione si veda la Tabella 1.

Il complesso AbI-AbII-HRP è stato rivelato con il Luminolo (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz) mediante esposizione su lastra fotografica (Kodak BioMax Light Film, SIGMA).

Tabella 1: Concentrazione e tempo di incubazione degli anticorpi primari e secondari utilizzati nell'immunorivelzione .

Le bande sono state quantificate con il programma Image-J 139u (Wayne Rasband National Institute of Health, USA) e i valori ottenuti sono stati dove necessario, corretti con l'ausilio della banda a 60kDa ottenuta con la colorazione della membrana con rosso Ponceau. I dati di densità ottica integrata ricavati dal programma sono stati trasformati in percentuale, portando a 100% il campione di controllo.

2.6.4.2 Immunocitochimica

Le PC12 sono state seminate su vetrini portaoggetto in piastre da 6 pozzetti, alla concentrazione di 200.000 cellule/pozzetto e sono state lasciate aderire per circa 24h. Successivamente sono state trattate come con cisplatino e flunarizina come visto nel capitolo precedente per tempi variabili da 5” a 72h. Per ogni prova sono stati preparati anche due campioni non trattati che servivano, uno come controllo per l’esperimento e l’altro come controllo per la reazione immunocitochimica (come spiegato più avanti).

Al termine del trattamento le PC12 sono state lavate con PBS 1X e fissate con PFA 4% per 30 minuti a T. A.. Dopo un lavaggio in PBS 1X si è proceduto all’immunorivelazione.

Le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di PBS 1X e Tween-20 allo 0.1% per 15minuti a T. A. in agitazione.

Seguivano due lavaggi in PBS 1X da 5 minuti l’uno.

In seguito sono stati bloccati i siti aspecifici con il Blocking Buffer (B. B.) (Tabella, 2) in C. U. a 37°C per 30 minuti. Seguiva il trattamento con l’anticorpo primario (AbI, Santa Cruz,) diluito in PBS 1X con l’1% di siero usato per il B. B. e si lasciava agire overnight in camera umida (C. U.) a 4°C (per le specifiche degli AbI utilizzati si veda la Tabella 2). In un vetrino di controllo non è stato messo l’AbI ma solo PBS all’1% di siero, tale campione ci ha permesso di valutare l’aspecifico dovuto all’anticorpo secondario.

Dopo due lavaggi in PBS 1X da 5 minuti l’uno in agitatore, le cellule sono state incubate con l’anticorpo secondario (AbII, SIGMA) legato al fluorocromo FITC (fenilisotiocianato), diluito in PBS 1X ed incubato in C.U. per 45 minuti T. A. al buio (per le concentrazioni anticorpali si veda la Tabella 2).

Seguivano due lavaggi in PBS 1X e infine sono stati colorati i nuclei cellulari con DAPI 1,09µM per 10 minuti a T. A., al buio.

Dopo lavaggio in PBS i vetrini con le cellule sono stati montati su vetrini coprioggetto con glicerolo al 20%.

I campioni sono stati osservati al microscopio ottico a fluorescenza e le immagini sono state elaborate con il programma MetaMorph 6.1 (Universal Imaging Corporation).

Tabella 2: Anticorpi primari, anticorpi secondari e sieri utilizzati per l'indagine immunocitochimica e relative concentrazioni.

2.7 INDAGINE STATISTICA

Al fine di valutare la significatività dei dati raccolti, ogni esperimento è stato ripetuto per almeno tre volte. I dati ricavati dai vari esperimenti sulla vitalità e dalla quantificazione dell'espressione proteica con il western blott sono stati analizzati con il programma InStat 3.5 (Graph Pad Software). Si è scelto d'analizzare i dati con un intervallo di confidenza del 95% e si è operata un'analisi della varianza univariata (ANOVA). Una probabilità d'errore d'analisi (p value= P), inferiore allo 0,05% è stata ritenuta significativa.

3 RISULTATI

I risultati ottenuti in questi tre anni di studio sono decritti di seguito trattando separatamente le due linee cellulari OC-k3 e PC12.

3.1 ESPERIMENTI SVOLTI SULLE OC-k3

3.1.1 Studio delle tossicità del cisplatino

Per documentare la tossicità del chemioterapico sulle OC-k3 è stata eseguita una indagine preliminare della vitalità con l'utilizzo della semplice conta cellulare. Le cellule per questo studio sono state trattate con concentrazioni di cisplatino (cis-DDP) pari a 5-13-50-100-200-300 μ M per tempi di trattamento di 24h, 48h e 72h, ed è stato ricavato un dato di vitalità espresso in numero di cellule vive per millilitro (N° cellule vive/ml).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la vitalità cellulare delle OC-k3 trattate con il chemioterapico era significativamente inferiore a quella del controllo (NT= non trattato) già a partire dalla concentrazione 5 μ M (che era la più bassa tra quelle utilizzate) e per tutti i tempi analizzati ($P < 0,05$ a 24h; $P < 0,001$ a 48 e 72h). Per ogni tempo di trattamento l'effetto tossico del cis-DDP aumentava al crescere della concentrazione (Fig. 24).

Osservando l'effetto delle varie dosi di cisplatino testate, era possibile notare come la tossicità aumentava con il trascorrere del tempo. Infatti, già a 48h risultava significativa la diminuzione della vitalità nei campioni trattati con cis-DDP 5 μ M ($P < 0,01$) rispetto alla stessa a 24h. La differenza diventava estremamente significativa dopo 72h di trattamento ($P < 0,001$). Inoltre, è emerso come a 24h, per tutte le concentrazioni analizzate, si avevano ancora un buon numero di cellule vive, anche se prossimo allo zero per dosi superiori alla 100 μ M. Invece, a 48h non sono state trovate

cellule vive a partire dai campioni trattati con cisplatino 100 μ M, mentre a 72h questa condizione si verificava già alla dose 50 μ M (Fig. 24).

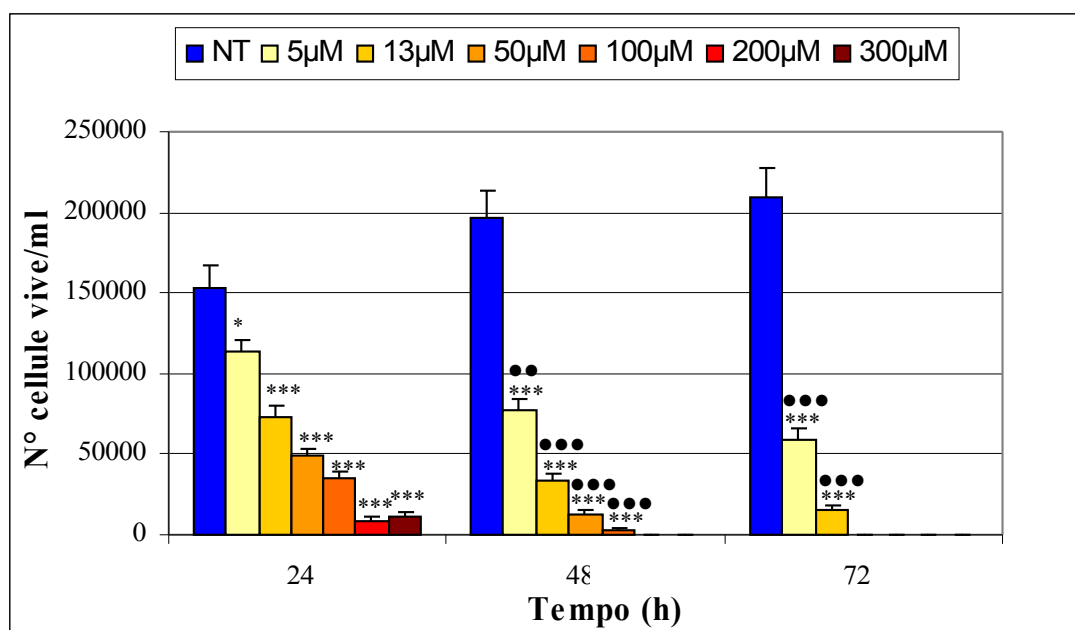


Figura 24: andamento della vitalità cellulare di OC-k3 trattate con cisplatino. Dati raccolti con i conteggi cellulari. *: significatività valutata entro ogni tempo di trattamento, calcolata rapportando il dato di ogni concentrazione al valore del non trattato (NT) (*: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$); •: significatività valutata per ogni concentrazione in confronto al valore corrispondente delle 24h (••: $P < 0,01$; •••: $P < 0,001$).

Sulla base dei dati raccolti dal conteggio l'indagine al citofluorimetro è stata ristretta ad un numero minore di concentrazioni di cisplatino (5-13-50-100 μ M) e a tempi di trattamento di 24h e 48h, in quanto dosi e tempi superiori erano risultati estremamente tossici per le OC-k3. In questo caso è stata valutata la mortalità cellulare, espressa in percentuale di cellule morte sulla popolazione totale.

L'analisi ha confermato l'effetto tossico del cis-DDP ma in questo caso l'aumento significativo della mortalità si aveva a partire dalla dose di cisplatino 50 μ M dopo 24h ($P < 0,01$) e 13 μ M dopo 48h ($P < 0,001$) con una mortalità rispettivamente pari al 28% e 38%. Aumentando la concentrazione del chemioterapico cresceva la mortalità raggiungendo valori massimi del 59% a 24h e del 70% a 48h alla dose 100 μ M. Per tutte le concentrazioni testate la mortalità a 48h risultava superiore a quella

misurata dopo 24h, l'aumento diventava significativo a partire dalla dose 13 μ M ($P<0,01$) ed estremamente significativo per concentrazioni superiori (50 e 100 μ M; $P<0,001$). (Fig. 25).

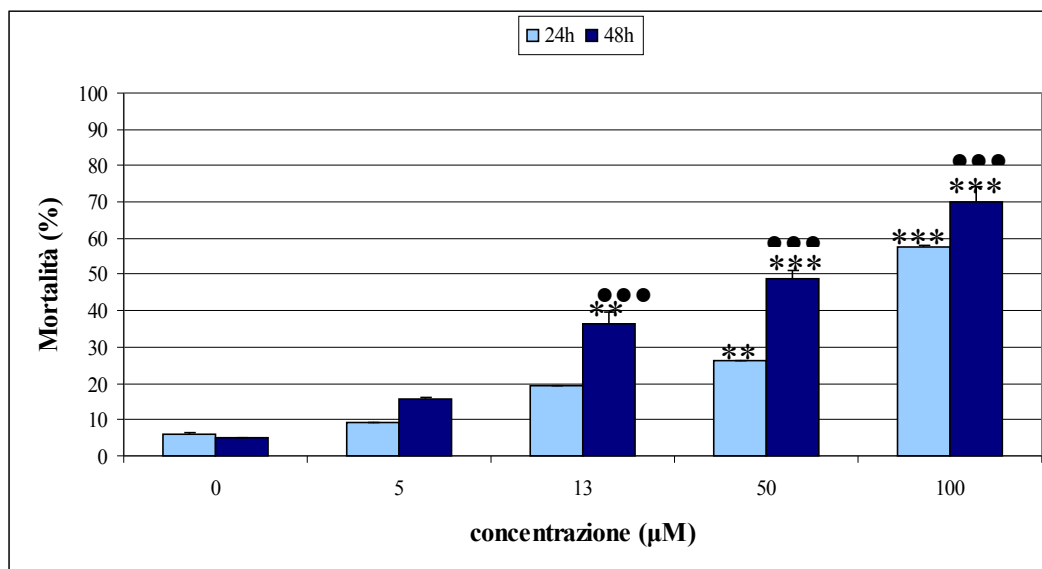


Figura 25: mortalità ottenuta con l'indagine al citofluorimetro sulle OC-k3 trattate con cisplatino. *: significatività valutata entro ogni tempo confrontando il dato di ogni concentrazione rispetto al valore del non trattato (0 μ M) (** $P<0,01$; *** $P<0,001$) •: significatività calcolata confrontando i due tempi di trattamento per ogni concentrazione (••: $P<0,01$; •••: $P<0,001$).

Da questi dati è quindi emerso che il cis-DDP ha un effetto tossico dose e tempo dipendente e che la concentrazione utile ai fini di uno studio di protezione è risultata essere la 13 μ M per la quale si aveva un mortalità pari al 20% dopo 24h di trattamento e al 40% dopo 48h. A concentrazioni superiori la mortalità è risultata troppo alta.

3.1.2 Analisi della tossicità del ginkgoselect

Prima di studiare il possibile utilizzo del ginkgoselect (ginkgo) come sostanza protettiva, è stata valutata la sua eventuale tossicità sulle OC-k3. La mortalità cellulare è stata testata al citofluorimetro per concentrazioni di ginkgo pari a 6,25-12,5-25-50-100-300 $\mu\text{g/ml}$ e per 24h e 48h.

Dai dati raccolti è emerso che il ginkgoselect non era tossico per le OC-k3 alle concentrazioni e tempi testati, in quanto la mortalità non si diversificava mai da quella del non trattato (campione 0 $\mu\text{g/ml}$), mantenendosi sempre a livelli prossimi al 7-8% (Fig. 26).

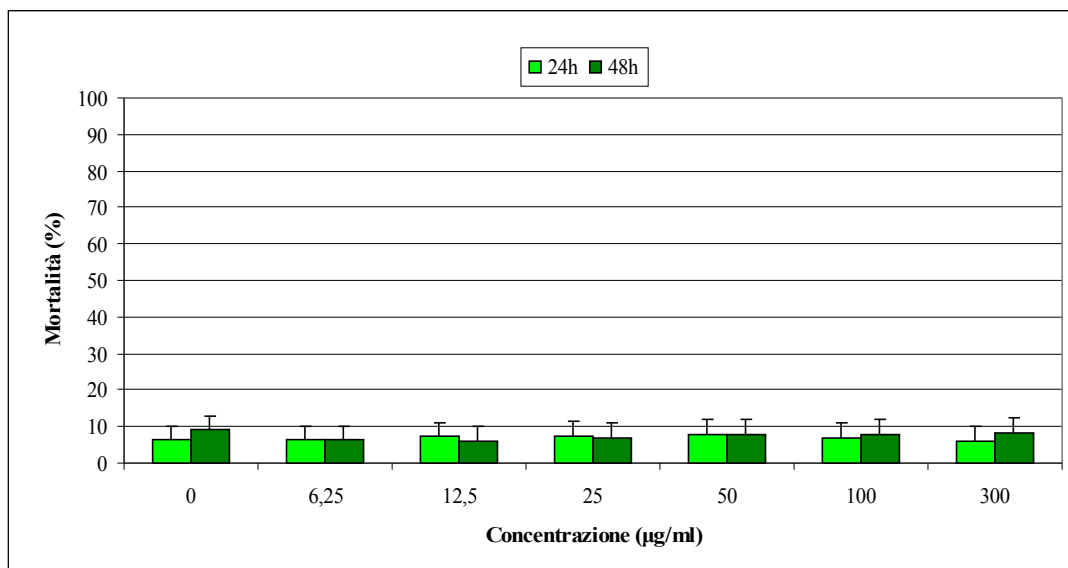


Figura 26: analisi citofluorimetrica della mortalità indotta dal ginkgoselect sulle OC-k3.

Pertanto è stato ritenuto possibile utilizzare questa sostanza per test di protezione dal cisplatino.

3.1.3 Studio della protezione del ginkgoselect

Per documentare se l'estratto di *Ginkgo biloba* era in grado di proteggere le OC-k3 dall'azione tossica del cisplatino le cellule sono state pretrattate con varie concentrazioni di ginkgoselect (6,25-12,5-25-50-100-150-200-300µg/ml) per 2h allo scadere delle quali è stato aggiunto il cisplatino 13µM e lasciato agire per 24h e 48h. In parallelo è stata valutata la possibile tossicità del solvente, il DMSO, alla concentrazione massima consentita (0,5%).

Lo studio della mortalità effettuato al citofluorimetro ha evidenziato come il DMSO 0,5% non era tossico per le OC-k3 sia dopo 24h sia dopo 48h di trattamento in quanto la mortalità non si discostava di molto da quella del non trattato (Fig. 27).

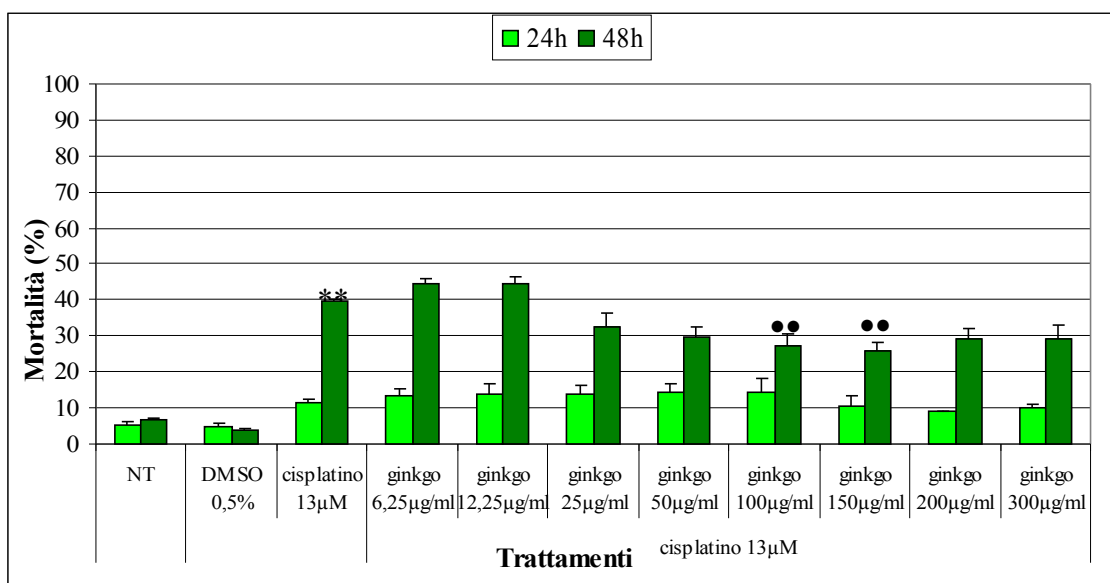


Figura 27: studio della protezione del ginkgoselect su OC-k3 trattate con cisplatino 13µM dopo pretrattamento di 2h. Analisi citofluorimetrica. *: significatività valutata rispetto al non trattato (**: P<0,01); ••: significatività calcolata rispetto al cisplatino (••: P<0,01).

Dopo 24h il ginkgo non era in grado di proteggere le cellule dall'azione tossica del cisplatino, infatti per tutte le concentrazioni di estratto usate nel pre-trattamento, non è stata notata una differenza significativa della mortalità rispetto a quella dovuta al solo cis-DDP. Al

contrario, dopo 48h di co-trattamento si è potuto notare che alle concentrazioni di ginkgoselect pari a 100µg/ml e 150µg/ml la mortalità del cisplatino era significativamente ridotta rispettivamente del 12,5% e del 13,9% (P<0,01) (Fig. 27).

In seguito, è stato ripetuto l'esperienza portando il tempo di pre-trattamento a 24h e il co-trattamento è stato valutato dopo 48h. In questo caso è stata testata la mortalità alla concentrazione pari a 300µg/ml e DMSO 0,5% somministrati per 72h (24h di pre-trattamento + 48h di co-trattamento).

Come mostrato in figura 28 sia il DMSO sia il ginkgo 300µg/ml causavano una mortalità significativa sulle OC-k3. Anche in questo caso il ginkgoselect si era dimostrato in grado di proteggere le OC-k3 dal cisplatino, ma, rispetto a quello documentato in precedenza con un pre-trattamento di 24h, si aveva una diminuzione della mortalità significativa per tutte le concentrazioni dell'estratto utilizzate. La massima protezione è stata documentata alla dose di ginkgoselect di 150µg/ml per la quale si osservava un recupero della vitalità pari al 22,5% (P<0,001) (Fig. 28).

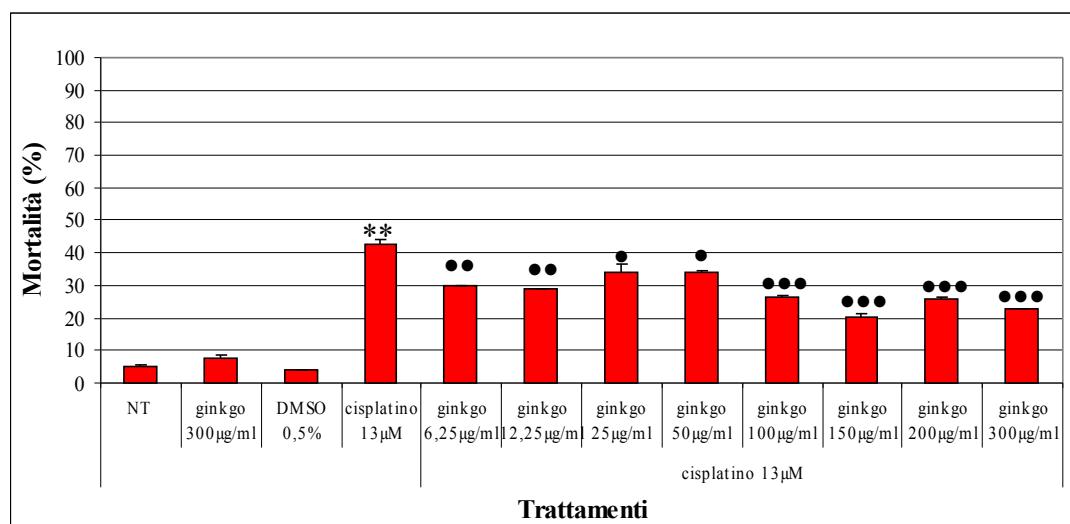


Figura 28: mortalità delle OC-k3 trattate per 48h con cisplatino 13µM dopo pretrattamento di 24h con ginkgoselect. *: significatività relativa al non trattato (**: P<0,01); ●: significatività rispetto al valore di mortalità del cisplatino 13µM (●●: P<0,01).

Una ulteriore prova è stata eseguita testando l'effetto protettivo nei confronti dell'azione tossica del cis-DDP 50 μ M sia pre-trattando per 2h, sia per 24h. Da questi esperimenti non erano emersi risultati significativi, e ciò confermava il fatto che questa dose di cisplatino era troppo tossica per le OC-k3. Infine, per verificare se per avere un effetto protettivo, il ginkgoselect doveva essere presente nel terreno in contemporanea con il cisplatino sono state ripetute le prove di protezione, con una variante, dopo il pre-trattamento con l'estratto il terreno vecchio veniva sostituito con quello pulito aggiunto del cis-DDP 13 μ M. I risultati hanno evidenziato che in queste condizioni il ginkgoselect non era più in grado di proteggere le OC-k3.

3.1.4 Studio del processo apoptotico

Per studiare se l'effetto protettivo del ginkgoselect si esplicava interferendo con l'apoptosi indotta dal cisplatino sono state eseguite indagini morfologiche (annessina-V e falloidina-DAPI), inoltre, è stata studiata la fase tardiva del processo con il DNA ladder.

3.1.4.1 Analisi morfologica dell'apoptosi con annessina V

Le OC-k3 sono state pre-trattate per 24h con le concentrazioni di ginkgoselect che dalle prove di protezione erano risultate essere quelle con la maggior capacità protettiva (100µg/ml o 150µg/ml); in seguito, è stato aggiunto e lasciato agire il cisplatino 13µM per 48h. Sono stati preparati anche dei controlli, uno con cellule non trattate, altri con OC-k3 trattate solo con cis-DDP 13µM (incubate per 48h) o con le concentrazioni di ginkgo usate nel co-trattamento per 72h (simulando le 24h di pre-trattamento più le 48h di co-trattamento).

Dalle immagini raccolte è emerso come sia le cellule non trattate, sia quelle trattate con il solo ginkgoselect si mantenevano in buono stato, ben adese alla fiasca e molto numerose (Figg. 29A, E, I); la maggior parte delle cellule erano annessina negative, indice che non erano in apoptosi, raramente sono state osservate anche cellule positive al propidio, giustificabili dal fatto che normalmente una piccola percentuale della popolazione cellulare muore (Figg. 29B, F, L).

Analizzando il campione trattato con il cisplatino si notava che le cellule in adesione erano meno numerose rispetto al non trattato e tutte presentavano una colorazione verde dovuta all'annessina-V, molte avevano anche il nucleo rosso per internalizzazione del propidio, a dimostrazione che il processo apoptotico era in atto (Figg. 29C, D).

Nei campioni co-trattati, le OC-k3 erano più numerose rispetto a quelle trattate con il solo cisplatino, inoltre, non risultavano positive

all'annexina-V e al PI se non in casi rari. Il pre-trattamento con ginkgoselect 150µg/ml dava risultati leggermente migliori rispetto al 100µg/ml e comunque molto simili alla condizione del campione non trattato (Figg. 29G, H, M, N).




Figura 29: valutazione morfologica dell'apoptosi sulle OC-k3. A, B: cellule non trattate; C, D: cellule trattate con cisplatino 13µM per 48h; E, F: cellule trattate con ginkgoselect 100µg/ml per 72h; G, H: cellule pre-trattate con ginkgoselect 100µg/ml per 24h e in seguito trattate con cisplatino 13µM per 48h; I, L: cellule trattate con ginkgoselect 150µg/ml per 72h; M, N: cellule pre-trattate con ginkgoselect 150µg/ml per 24 h, poi con cisplatino 13µM per 48 h. (A, C, E, G, I, M: immagini a contrasto di fase; B, D, F, H, L, N: color combine, in rosso il propidio e in verde l'annexinaV-FITC. Ingrandimento 40x).

3.1.4.2 Indagine morfologica dell'apoptosi con falloidina e DAPI

Lo stato del citoscheletro e dei nuclei è stato indagato trattando le OC-k3 nello stesso modo visto nel il paragrafo precedente (vedi 3.1.4.2).

Le cellule non trattate presentavano un citoscheletro in buono stato e i nuclei integri (Figg. 30A, B), lo stesso è stato osservato per le OC-k3 trattate con ginkgoselect 100 e 150 μ g/ml (Figg. 30E, F, I, L).



Figura 30: valutazione morfologica dello stato del citoscheletro e dei nuclei delle OC-k3. A, B: cellule non trattate; C, D: cellule trattate con cisplatino 13 μ M for 48h; E, F: cellule trattate con ginkgoselect 100 μ g/ml 72 h; G, H: cellule pre-trattate con ginkgoselect 100 μ g/ml 24h e in seguito trattate con cisplatino 13 μ M per 48h; I, L: cellule trattate con ginkgoselect 150 μ g/ml 72h; M, N: cellule pre trattate con ginkgoselect 150 μ g/ml per 24h, poi con cisplatino 13 μ M per 48h. (A, C, E, G, I, M: immagini a contrasto di fase; B, D, F, H, L, N: color combine, in rosso la falloidina-TRITC, in blu il DAPI. Ingrandimento 40X).

Il trattamento con il cisplatino 13 μ M causava, invece, alterazione tipiche dell'apoptosi, le fibre di actina del citoscheletro (colorate in rosso) si presentavano disorganizzate e redistribuite in prossimità del nucleo, tanto da indurre un cambiamento di forma della cellula, che da allungata diveniva simil-rotondeggiante. I nuclei si presentavano lievemente picnotici per via della condensazione della cromatina e in alcuni casi è stata documentata la divisione del nucleo in corpi globosi rotondeggianti (Figg. 30C, D).

Quando le OC-k3 vanivano co-trattate con ginkgoselect e cis-DDP lo stato del citoschetro veniva preservato e mantenuto in condizioni molto simili a quelle del non trattato, inoltre, i nuclei si presentavano per la maggior parte integri e senza picnosi (Figg. 30G, H, M, N).

3.1.4.3 Valutazione della fase tardiva con il DNA ladder

Lo studio della fase tardiva dell'apoptosi è stato eseguito su OC-k3 pre-trattate con ginkgoselect (25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g}/\text{m}$) per 2h o 24h e poi trattate con cisplatino 13 μM per altre 48h. Inoltre, è stato documentato anche l'effetto del solvente del ginko, il DMSO allo 0,5% per 48h e 72h.

In tutti i campioni esaminati non è mai stata osservata la formazione di frammenti di DNA tipica della fase tardiva dell'apoptosi, indice che alle condizioni sperimentali testate la morte cellulare avveniva senza frammentazione del genoma (Fig. 31).

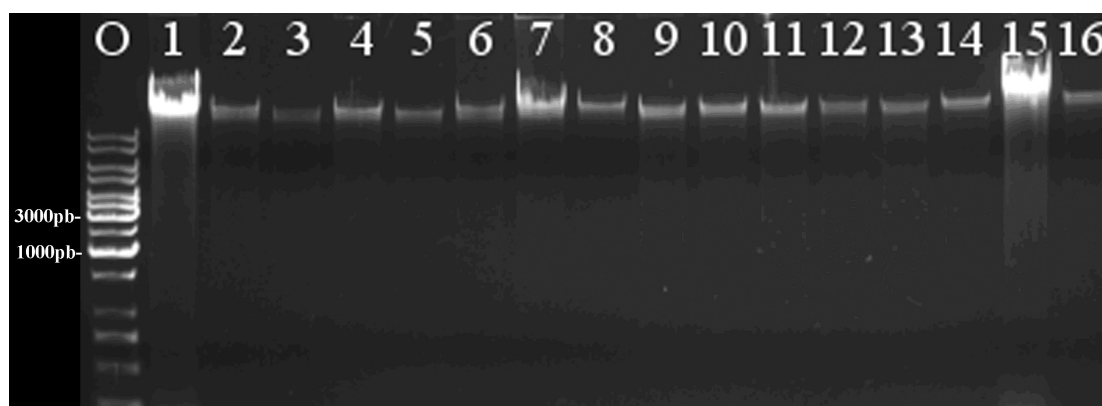


Figura 31: studio della frammentazione del DNA in OC-k3 trattate con cisplatino e ginkgoselect. Linea 0: pesi molecolari; linea 1: cellule non trattate; linee da 2 a 7: cellule pre-trattate con ginkgoselect (rispettivamente a 25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) per 2h, poi con cisplatino 13 μM per 48h; linee dalla 9 alla 14: cellule pre-trattate con ginkgoselect (rispettivamente a 25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ per 24h poi con cisplatino 13 μM per 48h; linee 8 e 15: cellule trattate con DMSO 0.5% rispettivamente per 48h e 72h; linea 16: cellule trattate con cisplatino 13 μM per 48h.

3.2 ESPERIMENTI SVOLTI SU PC12 INDIFFERENZIATE

3.2.1 Studio della tossicità del cisplatino

Con le conte cellulari è stata inizialmente eseguita una indagine generale per valutare la tossicità del cisplatino sulle PC12. Le cellule sono state trattate con cis-DDP alle concentrazioni di 5-13-50-100-200-300 μ M per 24h, 48h e 72h.

Analizzando i dati è emerso che in confronto con il campione di controllo (NT= non trattato), il trattamento con il cisplatino causava una forte riduzione del numero di cellule vive. Questa diminuzione della vitalità era significativa già per la dose 5 μ M ($P < 0,01$) e diveniva maggiore al crescere della concentrazione di cis-DDP. Questo evento si verificava per tutti i tempi testati (Fig. 32).

Ponendo l'attenzione alla variazione della vitalità cellulare nel tempo, si è notato che se per il campione di controllo il numero di cellule vive aumentava significativamente, mentre per i campioni trattati avveniva esattamente il contrario. Per ogni concentrazione testata la diminuzione tempo dipendente è risultata altamente significativa tra 24h vs 48h e 24h vs 72h ($P < 0,001$). Le uniche dosi di cisplatino per le quali la vitalità delle PC12 si manteneva a buoni livelli nelle 72h di trattamento erano la 5 μ M e la 13 μ M. Dalla concentrazione 50 μ M in poi si aveva una diminuzione della vitalità nel tempo molto più significativa, tanto da avere dopo 48h e 72h una mortalità pressochè totale alle alte dosi di cis-DDP (100-200-300 μ M) ($P < 0,001$) (Fig. 32).

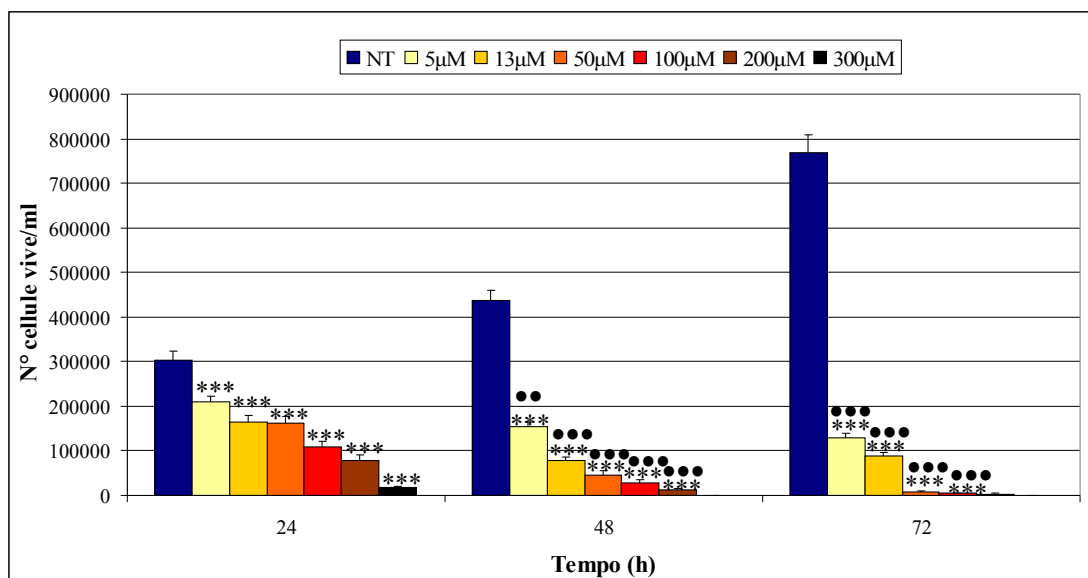


Figura 32: andamento della vitalità cellulare in PC12 trattate con cisplatino. Dati raccolti con i conteggi cellulari. *: significatività valutata entro ogni tempo di trattamento, calcolata rapportando il dato di ogni concentrazione al valore del non trattato (NT) (***: $P < 0,001$); •: significatività valutata per ogni concentrazione in confronto al valore corrispondente delle 24h (••: $P < 0,01$; •••: $P < 0,001$).

Le stesse prove sono state ripetute limitando i tempi di trattamento ad un massimo di 48h e valutando la vitalità cellulare con un metodo colorimetrico. L'analisi ha confermato la tossicità dose e tempo dipendente del cisplatino. Diversamente da quello osservato con le conte cellulari il calo della vitalità cominciava ad essere significativo, rispetto al valore del non trattato, a partire dalla concentrazione 100µM dopo 24h ($P < 0,05\%$) e dalla 50µM dopo 48h ($P < 0,05$). Per entrambi i tempi la tossicità cresceva aumentando le dosi di cis-DDP diventando altamente significativa a 48h ($P < 0,01$ per la dose 100µM; $P < 0,001$ per le concentrazioni 200µM e 300µM) (Fig. 33).

Anche per quanto riguardava la tempo dipendenza dell'azione tossica del cisplatino, si cominciava a notare una differenza significativa tra la vitalità a 24h e quella a 48h a partire dalla dose 50µM ($P < 0,05$) per poi diventare altamente significativa a concentrazioni maggiori ($P < 0,01$ per la dose 100µM; $P < 0,001$ per le concentrazioni 200µM e 300µM). Come nei conteggi anche con il saggio colorimetrico è risultato che le concentrazioni pari e superiori alla 50µM erano molto tossiche per le PC12, soprattutto dopo 48h di trattamento. Infatti, alla dose di cisplatino 100µM dopo 48h di

trattamento si aveva una riduzione delle vitalità di circa il 50% (Fig. 33), mentre, per le concentrazioni 5 μ M e 13 μ M si aveva una vitalità ridotta rispettivamente del 6% e 12% a 24h e del 8% e 17% a 48h

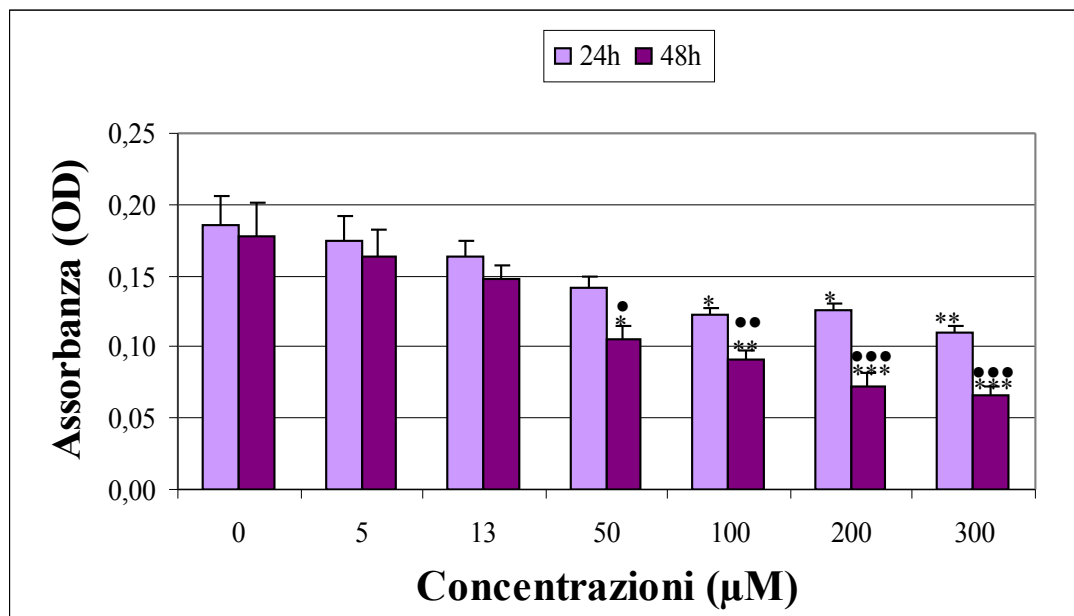


Figura 33: andamento della vitalità cellulare in PC12 trattate con cisplatino. Dati raccolti con il saggio colorimetrico con l'MTS. L'assorbanza è espressa come densità ottica (OD). *: significatività valutata entro ogni tempo di trattamento, calcolata rapportando il dato di ogni concentrazione al valore del non trattato (0 μ M) (*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001); •: significatività valutata per ogni concentrazione in confronto al valore corrispondente delle 24h (•: P<0,05; ••:P<0,01; •••: P<0,001).

Pertanto sulla base dei dati raccolti si è scelto di utilizzare come concentrazioni per i test di protezione la 5 μ M la 13 μ M che sono risultate le dosi limite oltre le quali la tossicità diventava troppo alta, è stata anche testata la protezione nei confronti della concentrazione di cisplatino 50 μ M.

3.2.2 Analisi della tossicità della flunarizina

Per poter scegliere la concentrazione ideale di flunarizina da utilizzare negli esperimenti di protezione dal cisplatino è stata d'apprima valutata la tossicità di questa sostanza sulle PC12. La vitalità cellulare è stata testata con il saggio colorimetrico per concentrazioni di flunarizina pari a 1-5-10-20-30 μ M per 24h e 48h. Inoltre, è stata valutata l'eventuale tossicità del solvente (il DMSO) alla concentrazione massima consentita (0,5%).

Il trattamento con il DMSO 0,5% non ha mostrato nessun effetto tossico sulle PC12. La flunarizina è risultata tossica per le cellule a concentrazioni superiori alla 10 μ M, infatti alla dose 20 μ M e 30 μ M si aveva una riduzione della vitalità pari rispettivamente al 25% e 36% a 24h e del 13% e 52% a 48h. La mortalità indotta dalla flunarizina 30 μ M a 48h risultava significativa ($P < 0,05$) (Fig. 34).

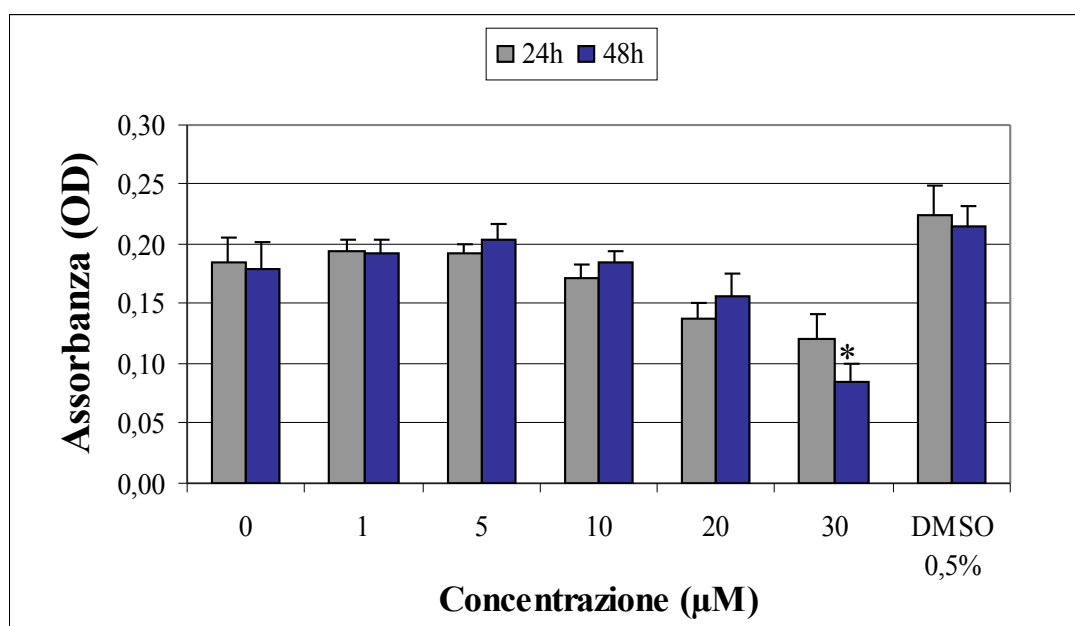


Figura 34: andamento della vitalità cellulare in PC12 trattate con flunarizina. Dati raccolti con il saggio colorimetrico con l'MTS. L'assorbanza è espressa come densità ottica (OD). *: significatività valutata entro ogni tempo di trattamento, calcolata rapportando il dato di ogni concentrazione al valore del non trattato (0 μ M) (*: $P < 0,05$).

La dose 10 μ M è risultata quella ideale per prove di tossicità in quanto sia a 24h sia a 48h la vitalità delle PC12 trattate con questa concentrazione

di flunarizina si mantenevano vitali come le cellule non trattate, inoltre era la dose massima utilizzabile, oltre la quale sarebbe diventata tossica per le cellule.

3.2.3 Saggio di protezione della flunarizina

Le prove di protezione sono state effettuate pre-trattando le PC12 con flunarizina 10 μ M per 30 minuti ed in seguito è stato aggiunto cisplatino 5 μ M o 13 μ M o 50 μ M per 24h e 48h.

I dati di ogni co-trattamento sono stati confrontati con quelli relativi alla corrispondente dose di cisplatino. Dai risultati raccolti è stato possibile notare come il pre-trattamento con flunarizina 10 μ M proteggeva le PC12 dall'azione tossica del cis-DDP per tutte e tre le concentrazioni testate, anche se i dati non sono risultati significativi (Fig. 35).

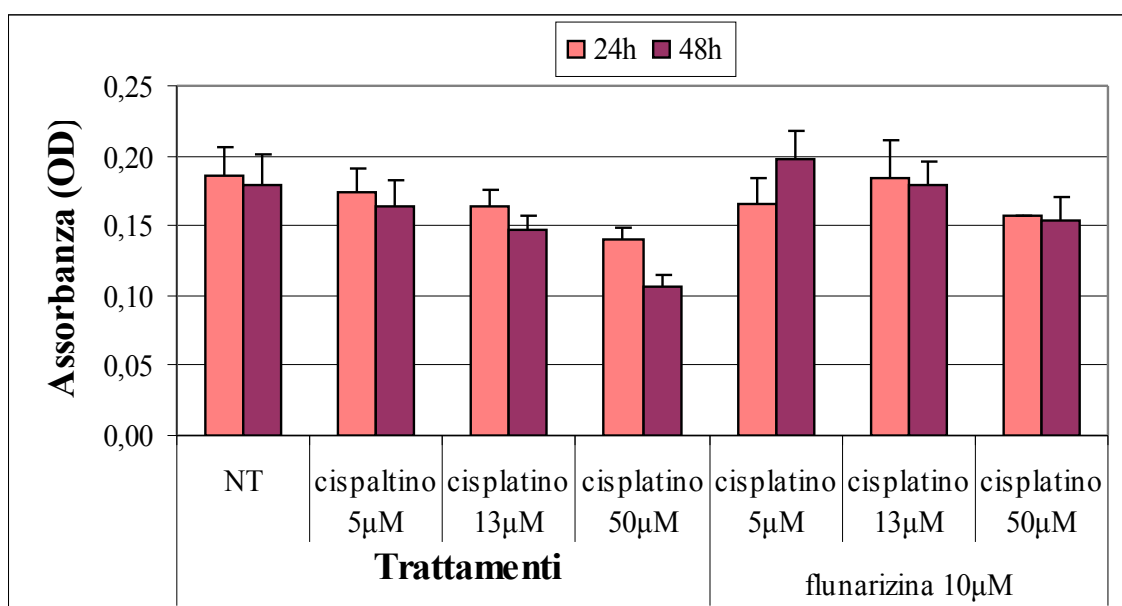


Figura 35: vitalità delle PC12 nelle prove di protezione con flunarizina 10 μ M e varie concentrazioni di cisplatino. Dati raccolti con il saggio colorimetrico con MTS. NT= non trattato.

Il pre-trattamento con flunarizina determinava, nei confronti del cisplatino 5 μ M, un recupero della vitalità pari al 19% ma solo dopo 48h di co-trattamento. Quando invece, venivano co-trattate le cellule con

cisplatino 13 μ M si osservava un aumento della vitalità cellulare pari al 11% dopo 24h e al 18% dopo 48h, portando per entrambi i tempi la vitalità agli stessi livelli del non trattato. Se veniva effettuato il co-trattamento con cisplatino 50 μ M il recupero risultava pari al 9% a 24h e al 27% a 48h ma in entrambi i casi non si ripristinavano le condizioni del controllo, rispetto al quale si aveva ancora un riduzione della vitalità di circa il 18% per entrambi i tempi.

Pertanto l'effetto protettivo della flunarizina risultava più efficace nei confronti del cisplatino 13 μ M in quanto riusciva a bloccare completamente la sua azione tossica cosa che non accadeva nei confronti della dose 50 μ M.

3.2.4 Studio morfologico del processo apoptotico

Dopo aver studiato la tossicità del cisplatino, si è voluto documentare se la morte cellulare avveniva per apoptosi e in che modo la flunarizina era in grado di proteggere le PC12.

L'indagine morfologica è stata eseguita sia con l'utilizzo del test dell'annessina-V sia valutando le alterazioni del citoscheletro e del nucleo.

3.2.4.1 Apoptosi indotta dal cisplatino

Le PC12 sono state trattate con diverse dosi di cis-DDP (13-50-100-200 μ M) per 48h.

Con il test dell'annessina-V le PC12 nel campione di controllo (cellule non trattate), risultavano numerose e in buono stato ed erano annessina e propidio negative (Fig. 36A, B). Il trattamento con cisplatino 13 μ M causava una riduzione del numero di cellule adese alla fiasca, alcune delle quali erano PI positive, indice, di mortalità. La maggior parte della popolazione cellulare aveva i contorni marcati con annessina-FITC, ad indicare che il processo apoptotico era in atto (Fig. 36C, D).

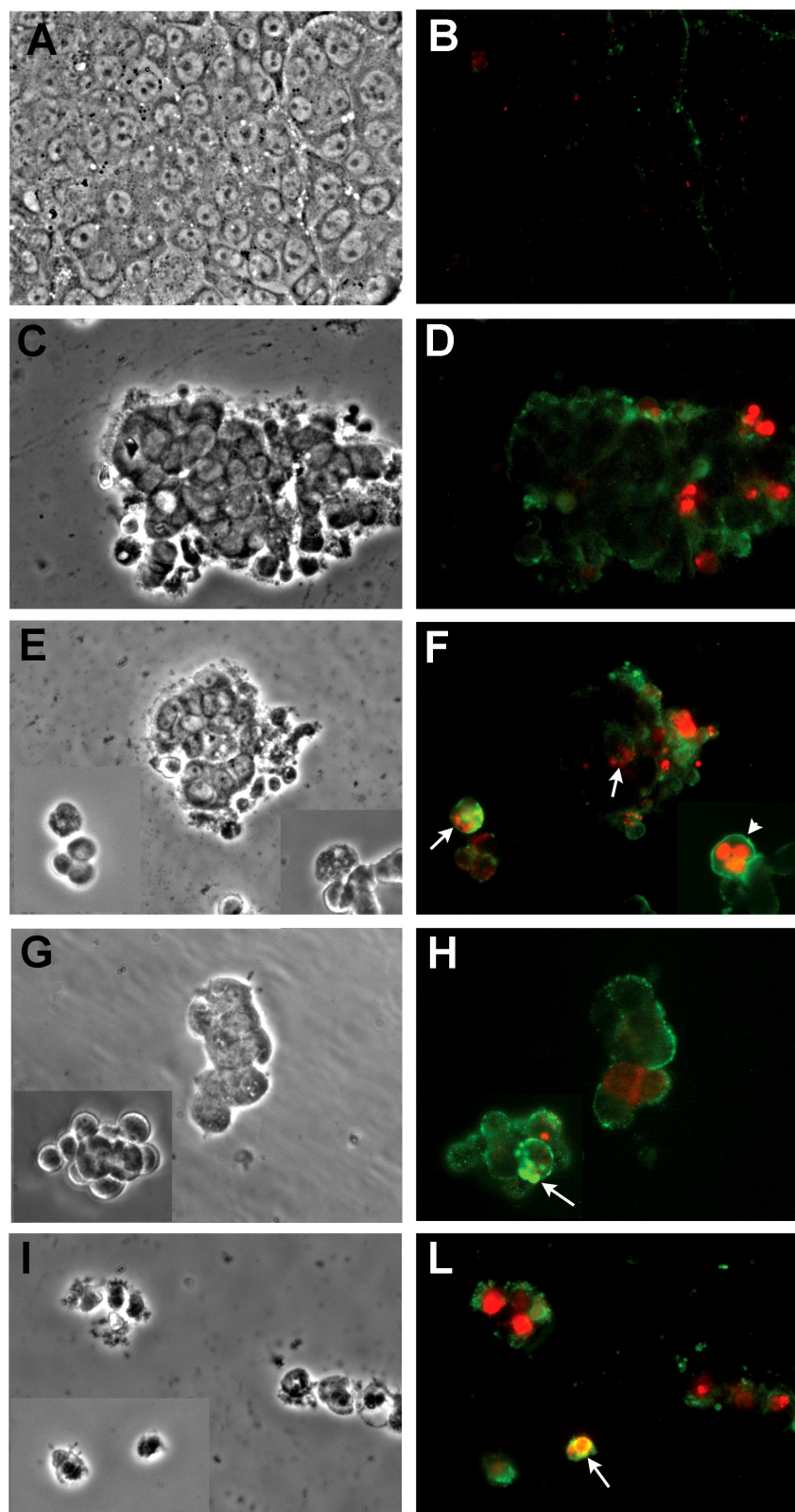


Figura 36: valutazione morfologica dell'apoptosi indotta dal cisplatino sulle PC12 dopo 48h di trattamento. A, B: non trattato; C-L: trattati con cisplatino (C, D: 13 μ M; E, F: 50 μ M-le frecce indicano la marginalizzazione delle cromatina, la testa di freccia indica la frammentazione del nucleo; G, H: 100 μ M-la freccia indica la formazione di vescicole; I, L: 200 μ M-la freccia indica la frammentazione della cromatina). A, C, E, G, I: immagini a contrasto di fase; B, D, F, H, L: color combine, in rosso il propidio e in verde l'annessina-V. Ingrandimento 40X.

Quando le PC12 venivano trattate con cis-DDP 50 μ M si notava una ulteriore diminuzione delle cellule in adesione, tanto da trovarne in numero maggiore in sospensione. Le PC12 adese si presentavano ristrette, tutte annessina positive e molte con i nuclei colorati in rosso, questi fattori erano indice di un processo apoptotico avanzato, ed alcune cellule erano probabilmente morte per necrosi. Soprattutto le PC12 in sospensione, presentavano la cromatina condensata con un principio di marginalizzazione, mentre in rari casi è stata osservata una frammentazione del nucleo in corpi rotondeggianti (Fig. 36E, F).

Trattando le cellule con cisplatino 100 μ M e 200 μ M se ne osservavano pochissime rimaste adese e quasi tutte in sospensione. Alla dose 100 μ M sono state documentate cellule con estroflessioni tipiche della fase terminale dell'apoptosi (blebbing) (Fig. 36G, H). Il trattamento con cis-DDP 200 μ M causava la frammentazione della membrana, i nuclei erano propidio positivi, la struttura cellulare era compromessa e probabilmente le cellule erano morte per necrosi (Fig. 36I, L).

Studiando il citoscheletro si è potuto notare che le PC12 di controllo presentavano i filamenti di actina integri e ben distribuiti entro le cellule. Ciò conferiva loro una forma leggermente schiacciata permettendo di aderire bene alla fiasca e di aggregarsi l'un l'altre. Le PC12 apparivano come rivestite di aghi, poiché queste cellule sono in grado di crescere in multistrato, dovevano avere un citoscheletro che permettesse la formazione di legami "tridimensionali" intercellulari. (Fig 37A, B).

Il trattamento con cisplatino 13 μ M causava un alterazione del citoscheletro i cui filamenti cominciavano ad accorciarsi tanto che le cellule iniziavano ad assumere una forma rotondeggiante e a distaccarsi più facilmente le une con le altre (Fig. 37C, D).

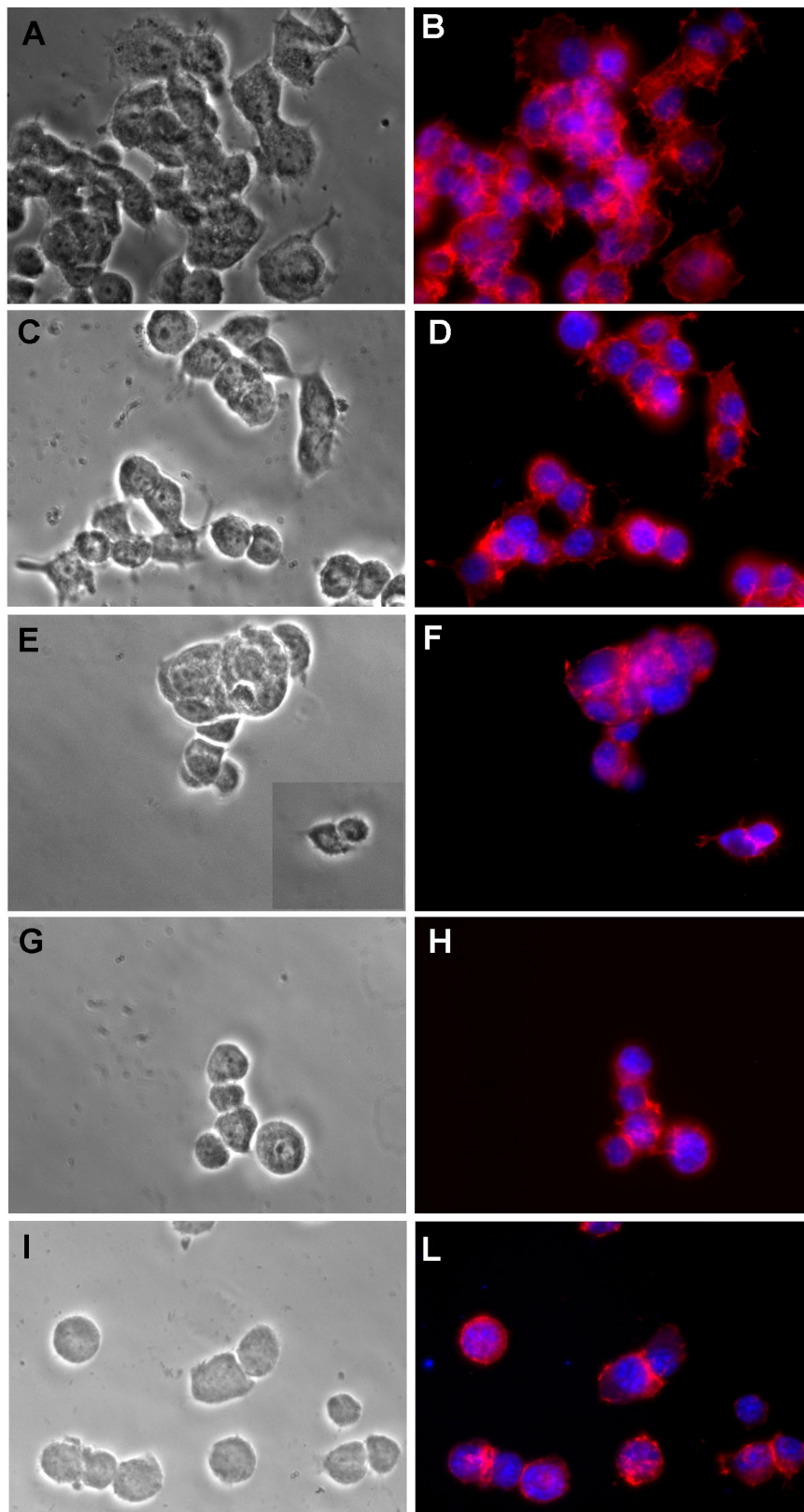


Figura 37: analisi dello stato del citoscheletro e dei nuclei su PC12 trattate per 48h con cisplatino. A, B: non trattato; C-L: trattati con cisplatino (C, D: 13 μ M; E, F: 50 μ M; G, H: 100 μ M; I, L: 200 μ M). A, C, E, G, I: immagini a contrasto di fase; B, D, F, H, L: color combine, in rosso la falloidina e in blu il DAPI. Ingrandimento 60X.

All'aumentare della concentrazione di cisplatino (50-100-200 μ M) si osservava un peggioramento dello stato del citoscheletro, la marcatura si presentava sempre più a ridosso del nucleo (Fig. 37E-L), questo fenomeno era associato con il restringimento cellulare che a dosi elevate (100-200 μ M) comportava la quasi totale scomparsa del citoplasma (Fig. 37G-L). Le alterazioni documentate causavano una incapacità delle cellule di restare adese alla fiasca e di aggregarsi fra di loro.

La colorazione dei nuclei con il DAPI ha evidenziato in alcuni casi la condensazione della cromatina soprattutto a dosi elevate di cisplatino (50-100-200 μ M) e in casi rari è stata documentata la frammentazione del nucleo.

3.2.4.3 Valutazione della capacità protettiva della flunarizina

L'apoptosi è stata inseguito analizzata su PC12 pre-trattate per 30 minuti con flunarizina 10 μ M e in seguito con cisplatino (13 μ M o 50 μ M) per 48h. La scelta delle concentrazioni su cui documentare la morte cellulare programmata è nata sulla base dei dati raccolti precedentemente con lo studio della vitalità. Oltre al campione non trattato sono stati messi come riferimenti le PC12 trattate con le due dosi di cisplatino e quelle trattate con la flunarizina.

L'indagine con l'annessina-V ha evidenziato che che la flunarizina 10 μ M non danneggiava le cellule che si mantenevano ben numerose e, come quelle del controllo, non esprimevano i marker apoptotici (Fig. 38A-D).

Se il trattamento con il ciplatino (ad entrambe le dosi testate) causava mortalità con riduzione del numero di cellule in adesione e induzione dell'apoptosi, il pre-trattamento con flunarizina portava dei miglioramenti su tutti e due i fronti. Nel caso del co-trattamento con flunarizina e cisplatino 13 μ M le cellule non si coloravano né in verde, né in rosso tanto da assumere una aspetto del tutto paragonabile al non trattato (Fig. 38G, H).

Nel co-trattamento con cis-DDP 50 μ M (Fig. 38M, N), si notava un cospicuo aumento delle cellule in adesione anche se risultavano tutte positive all'annessina-V e alcune al PI, avvicinandosi molto alla situazione descritta per il trattamento con il solo cisplatino 13 μ M (Fig. 38E, F).

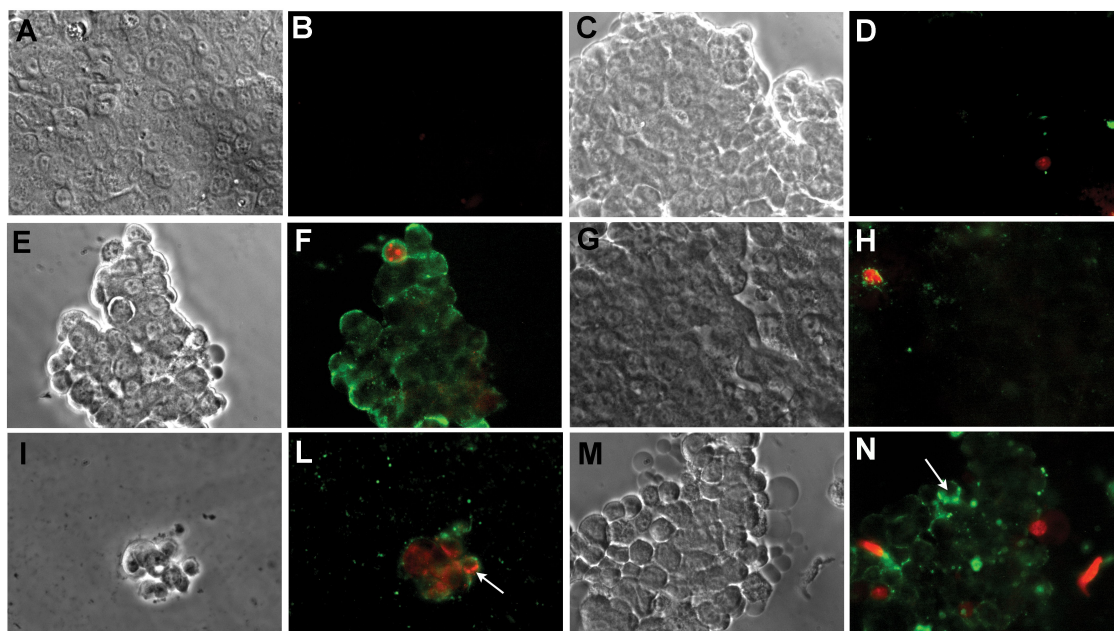


Figura 38: studio morfologico dell'apoptosi con annessina-V su PC12 pre-trattate con flunarizina 10 μ M per 30 minuti e successivamente trattate con cisplatino 13 μ M o 50 μ M per 48h. A, B: non trattato; C, D: trattati con flunarizina; E, F: trattati con cis-DDP13 μ M; G, H: co-trattamento con flunarizina e cisplatino 13 μ M; I, L: trattamento con cis-DDP 50 μ M-la freccia indica la marginalizzazione della cromatina; M, N: - con flunarizina e cisplatino 50 μ M- la freccia indica la formazione di blebbing.(A, C, E, G, I, M: immagini a contrasto di fase; B, D, F, H, L, N: color combine, in rosso il propidio e in verde l'annessina-V. Ingrandimento 40X).

Studiando lo stato del citoscheletro si è potuto notare che le cellule trattate con flunarizina 10 μ M presentavano un aspetto simile a quello del campione non trattato (Fig. 39A-D).

Ad entrambe le concentrazioni di cisplatino testate (13 μ M e 50 μ M) le cellule subivano una disorganizzazione del citoscheletro tale da provocare un cambiamento di forma con distacco dalla fiasca e passaggio in sospensione di alcune cellule, questi danni erano maggiori per la dose 50 μ M (Fig. 39E, F, I, L). Quando venivano effettuati i co-trattamenti, si notavano dei lievi miglioramenti. Se per le cellule co-trattate con

flunarizina e cis-DDP 13 μ M si osservava un citoscheletro in buone condizioni, abbastanza vicine al non trattato (Fig. 39G, H), per quello co-trattate con cisplatino 50 μ M il miglioramento era più lieve. Quest'ultime avevano il citoscheletro alterato e principalmente concentrato in prossimità del nucleo, ma rispetto al trattamento con il solo cis-DDP 50 μ M venivano mantenuti più legami con le cellule adiacenti e il restringimento cellulare sembrava meno evidente (Fig. 39L, M).

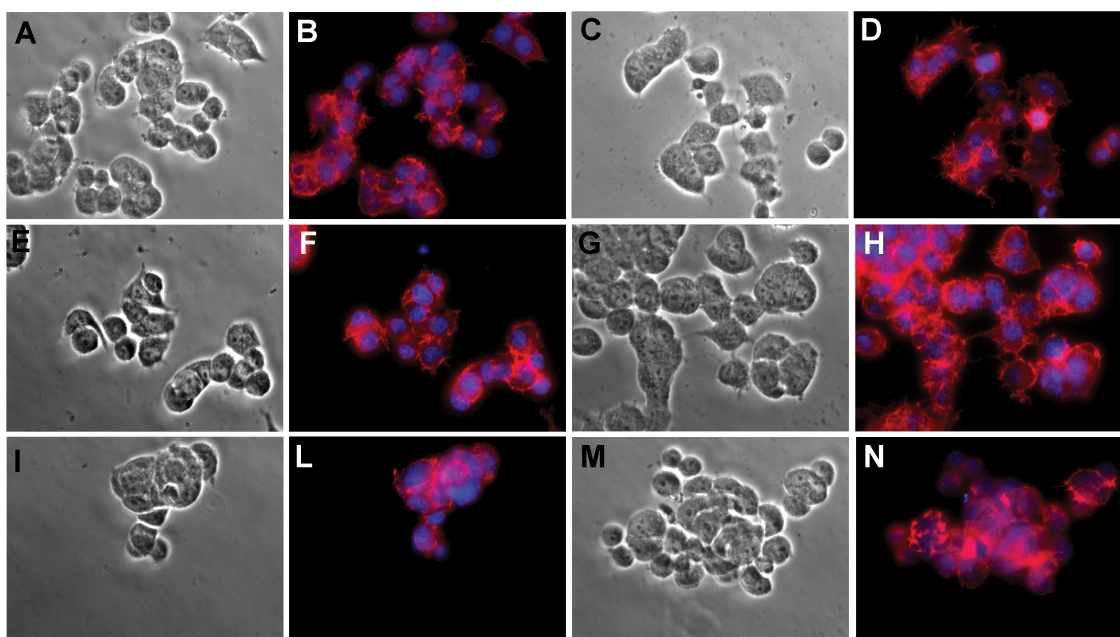


Figura 39: analisi dello stato del citoscheletro e dei nuclei su PC12 pre-trattate con flunarizina 10 μ M per 30 minuti e successivamente trattate con cisplatino 13 μ M o 50 μ M per 48h. A, B: non trattato; C, D: trattati con flunarizina; E, F: trattati con cis-DDP13 μ M; G, H: co-trattamento con flunarizina e cisplatino 13 μ M; I, L: trattamento con cis-DDP 50 μ M; M, N: co-trattamento con flunarizina e cisplatino 50 μ M. (A, C, E, G, I, M: immagini a contrasto di fase; B, D, F, H, L, N: color combine, in rosso la falloidina in blu il DAPI. Ingrandimento 60X).

Questi dati concordavano con quello osservato con le prove di vitalità mettendo in luce il fatto che la flunarizina aveva una efficacia di protezione maggiore nei confronti del cisplatino 13 μ M rispetto al 50 μ M. Anche se era in grado di mantenere le cellule in condizioni molto prossime allo stato del controllo la flunarizina non sembrava tuttavia in grado di conferire una protezione totale nei confronti dei danni a carico del citoscheletro.

3.2.5 Analisi dell'apoptosi con il DNA ladder

Le PC12 trattate con cisplatino a varie dosi (5-13-50-100-200 μ M) per 48h sono state analizzate con la tecnica del DNA ladder.

Dallo studio effettuato è emerso che per le concentrazioni di cisplatino e i tempi testati non si osservava la frammentazione del DNA tipica della fase tardiva dell'apoptosi (Fig. 40)

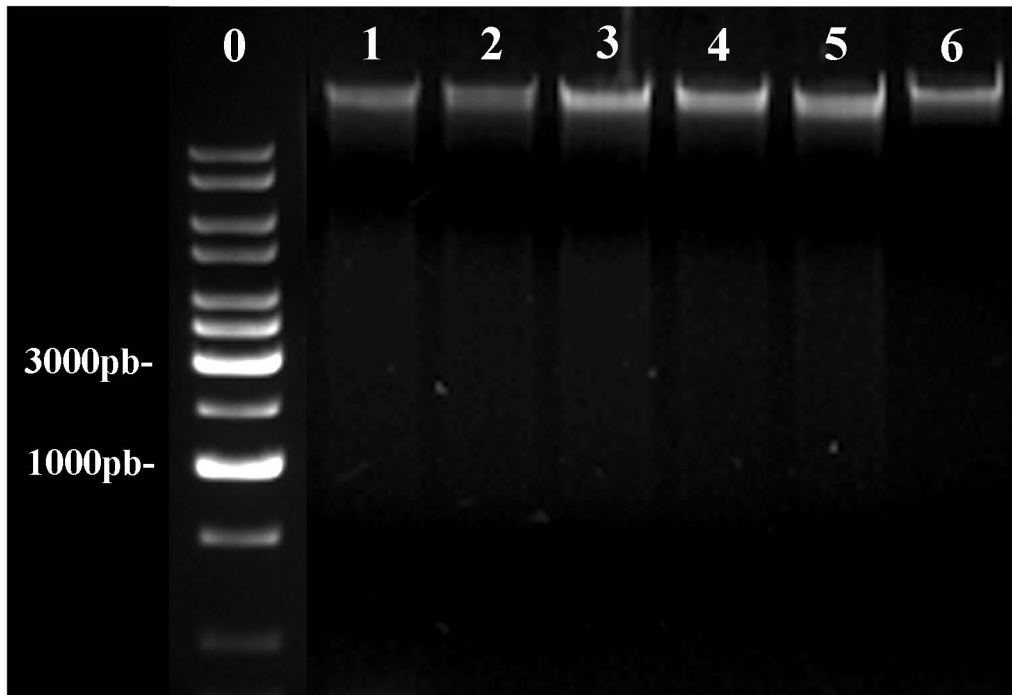


Figura 40: studio della frammentazione del DNA in PC12 trattate con varie dosi di cisplatino per 48h. Linea 0: pesi molecolari; linea 1: cellule non trattate; linee da 2 a 6: cellule trattate con cisplatino (rispettivamente a 5, 13, 50, 100 e 200 μ M).

Questo dato indicava che le PC12 morivano senza frammentare il nucleo.

3.2.6 Studio dell'espressione di proteine coinvolte nel processo apoptotico

Sulla base dei dati raccolti sia dallo studio della vitalità, sia dall'analisi morfologica dell'apoptosi, si è deciso di indagare l'espressione di proteine implicate nel processo apoptotico in cellule trattate con cisplatino 13 μ M, con flunarizina 10 μ M e con entrambe le sostanze (co-trattamento). Le PC12 sono state trattate per tempi variabili da 5 secondi a 72h e su queste sono state eseguite indagini quantitative (western blot) e qualitative (immunocitochimica).

Le immagini dei western blott, riportate di seguito per ogni proteina studiata, sono le più rappresentative dell'andamento medio (ottenuto dalla quantificazione delle bande di espressione di almeno tre prove) i cui dati sono riportati nei grafici.

3.2.5.1 ERK1/2 e JNK

L'indagine eseguita sia sulla fosforilazione delle ERK sia del JNK ha evidenziato che alla concentrazione di cisplatino 13 μ M, per i tempi testati, le proteine in esame non venivano mai attivate (Fig. 41).

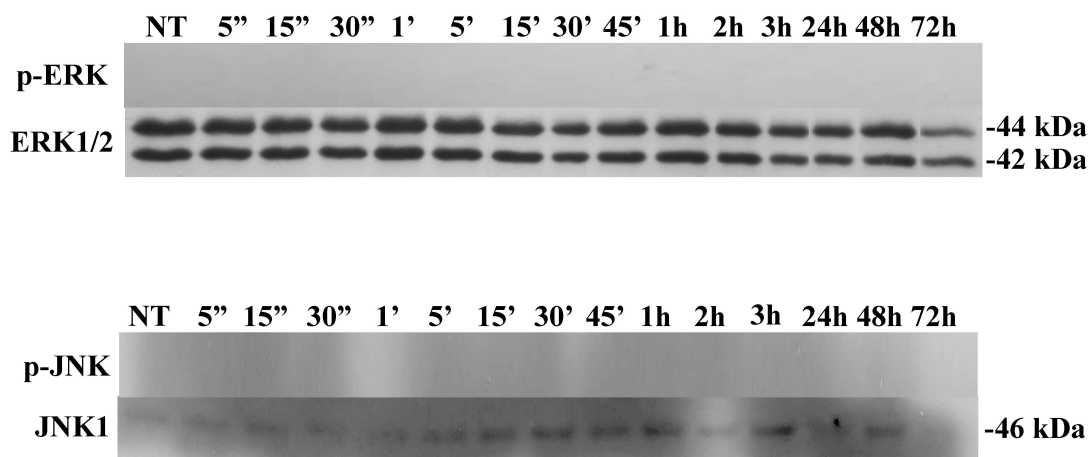


Figura 41: PC12 trattate con cisplatino 13 μ M per l'intervallo di tempo 5''-72h. Bande di espressione delle ERK1/2 e del JNK1 e le corrispettive forme fosforilate. NT=non trattato.

3.2.5.2 PKC α

L'andamento dell'espressione della PKC α , in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M, sembrava essere bifasico. Dopo 5 secondi di esposizione al farmaco si aveva già un aumento della proteina, la cui espressione raggiungeva un picco massimo dopo 30 secondi di trattamento per restare ad alti livelli fino a 30 minuti a cui seguiva un graduale calo della proteina fino a 1h. Quando l'esposizione al farmaco arrivava a 2h la PKC α raggiungeva il secondo picco di espressione più alto del precedente. In seguito, la proteina calava nuovamente fino a raggiungere il valore del campione di controllo a 48h e il più basso in assoluto dopo 72h (Fig. 42A, D).

Il trattamento con flunarizina non causava delle variazioni dell'espressione della PKC α che si manteneva più o meno ai livelli del non trattato (NT), se non per un lieve picco riscontrato dopo 3h di trattamento (Fig. 42B, D).

Quando veniva eseguito il co-trattamento si notava che la flunarizina era in grado di bloccare l'aumento di espressione della proteina indotto dal trattamento con il cisplatino. Infatti, dopo 5 secondi di co-trattamento, il livello della PKC α aumentava nello stesso identico modo osservato per il cis-DDP, ma già dopo 15 secondi si aveva una riduzione dell'espressione della proteina che veniva mantenuta a livelli prossimi a quello del campione NT. Si osservava dopo 1h di esposizione un ulteriore lieve aumento della PKC α corrispondente a quello documentato per il cis-DDP, ma anche in questo caso si osservava un successivo calo della proteina fino a raggiungere livelli bassissimi quasi prossimi allo zero dopo 72h (Fig. 42C, D).

Quindi il pre-trattamento con flunarizina tendeva ad abbassare i livelli di espressione della PKC α .

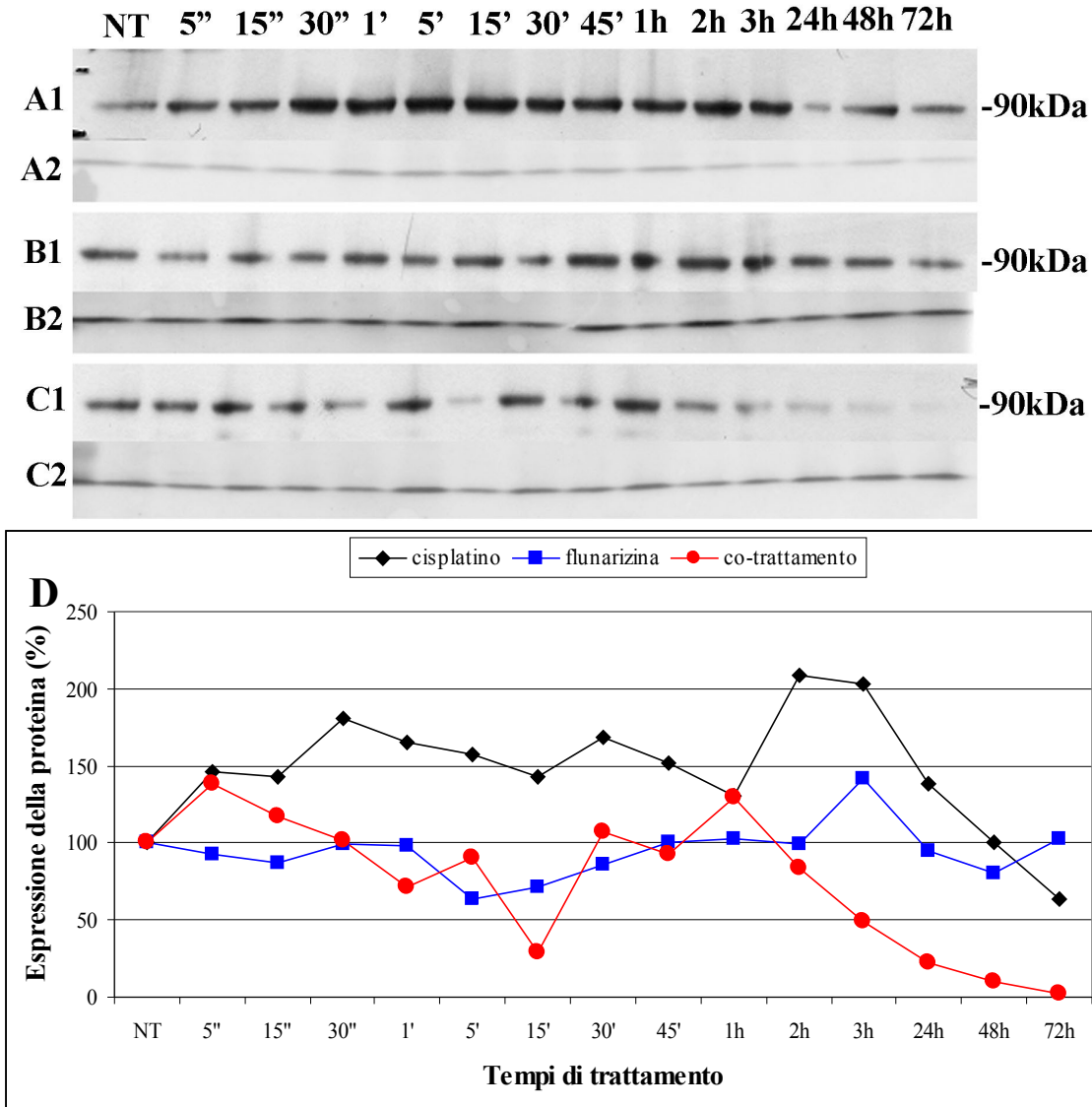


Figura 42: andamento dell'espressione della proteina PKC α nel tempo in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M (A), flunarizina 10 μ M (B) o co-trattate (C). le linee 1 rappresentano la proteina, le linee 2 sono i rispettivi ponceau. D: grafico della quantificazione delle bande. La quantità di proteina è espressa in percentuale rispetto al valore del non trattato (NT) che è stato assunto come il 100%.

Studiando la localizzazione della proteina che nel campione di controllo si presentava diffusa a livello citoplasmatico, è stato notato che dopo 15 secondi di trattamento con cisplatino la PKC α cominciava a localizzarsi a ridosso della membrana citoplasmatica. Questo fenomeno è stato osservato sia dopo 30 secondi sia dopo 30 minuti diventando più marcato con il trascorrere del tempo. Fino a 1h dal trattamento si osservava questa localizzazione della PKC α che successivamente andava via via

scomparendo fino a 24h quando si presentava diffusa omogeneamente nel citoplasma (Fig. 43).

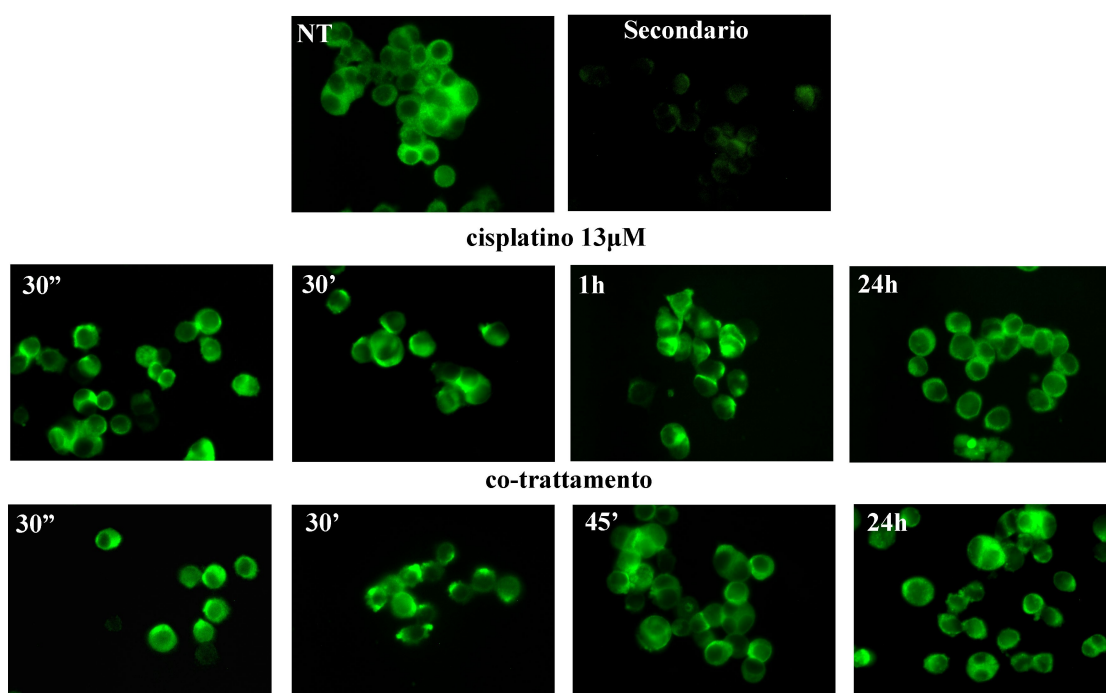


Figura 43: time course dell'espressione della PKC α in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M e co-trattate (flunarizina 10 μ M per 30 minuti e in seguito cisplatino 13 μ M). In verde si nota la marcatura dovuta al secondario FITC. NT=non trattato. Ingrandimento 40X.

Il trattamento con sola flunarizina non determinava mai la migrazione della PKC α alla membrana. Mentre quando avveniva il co-trattamento si avevano eventi simili a quelli osservati nel caso delle PC12 esposte al cisplatino. Infatti, la localizzazione di membrana cominciava già dopo 15 secondi e aumentava con il passare del tempo, ma a differenza di quello osservato in precedenza, nei campioni co-trattati questo evento si aveva fino a circa 30 minuti, dopo i quali la proteina ritornava lentamente ad essere diffusa nel citoplasma (Fig. 43).

3.2.5.3 PKC ζ

L'espressione della PKC ζ in cellule trattate con cisplatino 13 μ M sembrava avere un andamento crescente fino alle 24h. Il trattamento con cis-DDP causava un aumento lento e abbastanza graduale dell'espressione proteica che raggiungeva il suo primo valore massimo dopo 15 minuti (con una piccola punta di espressione dopo 30 secondi). L'alto livello di espressione veniva mantenuto fino a 30 minuti per poi diminuire gradualmente ma restando sempre a valori più elevati rispetto al controllo (NT). La seconda fase di crescita cominciava dopo 1h, la proteina lentamente e in modo graduale raggiungeva il secondo picco di espressione, il più alto in assoluto dopo 24h di trattamento. Seguiva una progressiva riduzione a 48h e 72h (Fig. 44A, D).

Quando alle PC12 veniva somministrata flunarizina 10 μ M non si osservavano grosse variazioni del livello di espressione della PKC ζ che si aggirava attorno al valore del campione NT per tutti i tempi testati (Fig. 44B, D).

La PKC ζ nei campioni sottoposti a co-trattamento seguivano un andamento analogo a quello osservato per i quelli trattati con sola flunarizina (Fig. 44C, D).

Anche in questo caso, come per la PKC α il pre-trattamento con flunarizina aveva la tendenza ad abbassare i livelli di espressione della PKC ζ con un'effetto che va più efficace nei confronti di quest'ultima.

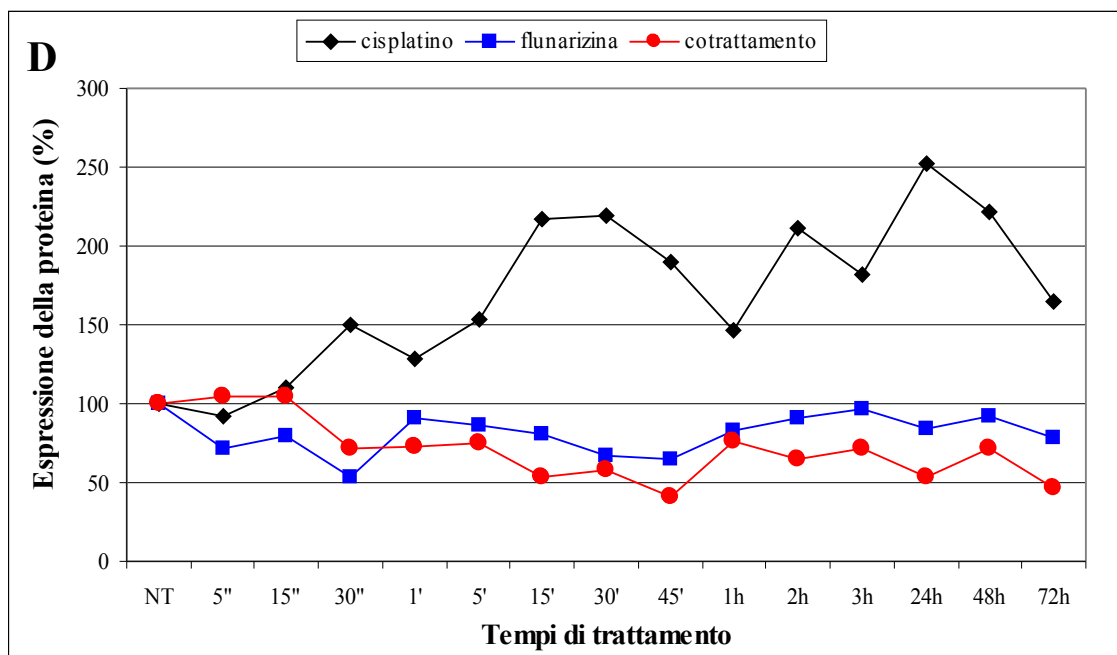
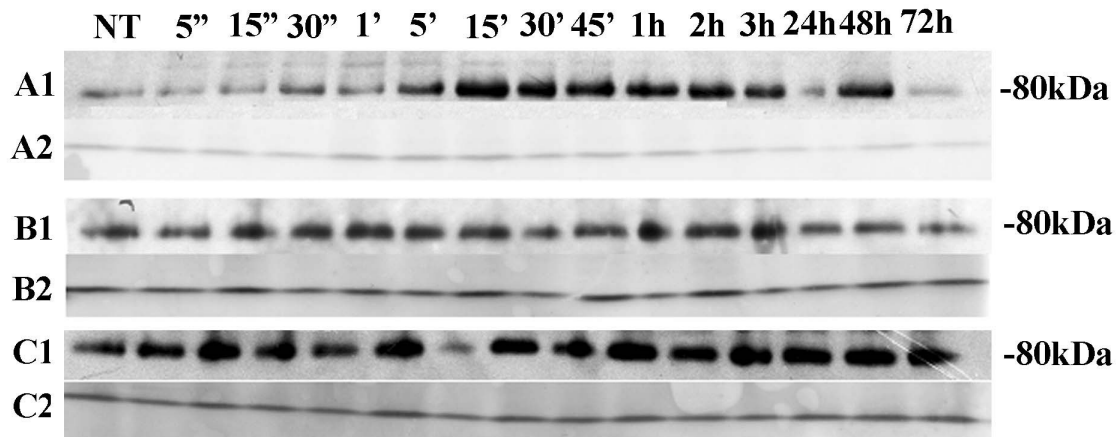


Figura 44: andamento dell'espressione della proteina PKC ζ nel tempo in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M (A), flunarizina 10 μ M (B) o co-trattate (C). Le linee 1 rappresentano la proteina, le linee 2 sono i rispettivi ponceau. D: grafico della quantificazione delle bande. La quantità di proteina è espressa in percentuale rispetto al valore del non trattato (NT) che è stato assunto come il 100%.

Lo studio qualitativo dell'espressione delle PKC ζ ha evidenziato come nelle PC12 di controllo la proteina era espressa nel citoplasma ma localizzata in prossimità della membrana nucleare (Fig. 45).

Quando le cellule erano trattate con cisplatino la localizzazione diveniva sempre più prossima al nucleo e questo fenomeno era massimo dopo 3h di esposizione e osservabile fino a 72h dove si notava la marcatura molto vicina e in alcuni casi anche nucleare (Fig. 45).

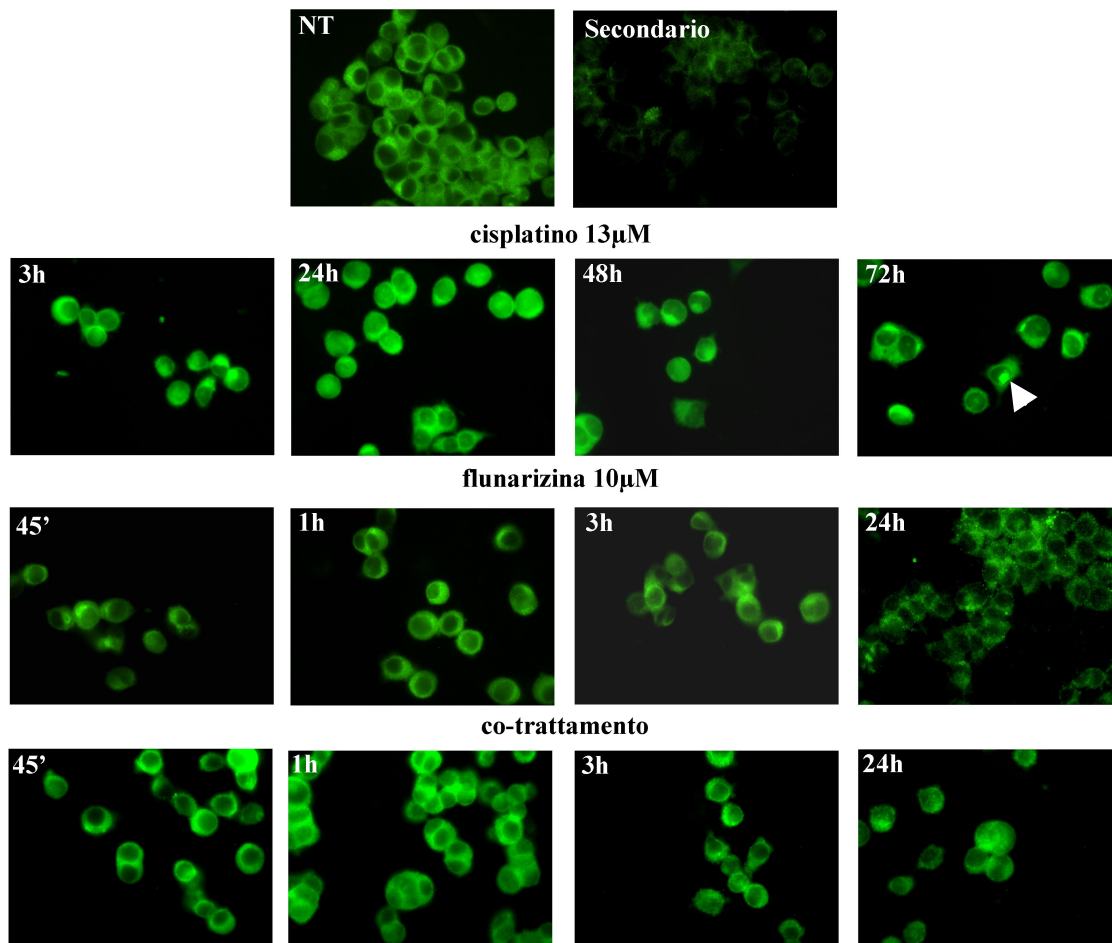


Figura 45: time course dell'espressione della PKCζ in PC12 trattate con cisplatino 13μM, flunarizina 10μM e co-trattate. In verde si nota la marcatura dovuta al secondario FITC; la freccia indica la marcatura nucleare. NT=non trattato. Ingrandimento 40X.

Nell PC12 sottoposte a trattamento con flunarizina e a co-trattamento si osservava un comportamento simile. La proteina restava localizzata nel citoplasma per lo più in prossimità del nucleo ma non si osservava mai un aumento della localizzazione, dopo 24h di trattamento oltre ad osservare una drastica diminuzione della marcatura questa diveniva per lo più diffusa nel citosol (Fig. 45).

3.2.5.4 PKC δ

L'ultima isoforma di PKC studiata era la δ . L'andamento dell'espressione di questa proteina nelle PC12 trattate con cisplatino era di tipo bifasico, caratterizzato da un primo picco dopo 5 secondi di esposizione al chemioterapico. Il livello della proteina scendeva fino ad un minimo registrato dopo 5 minuti per poi risalire lentamente fino a raggiungere il secondo picco dopo 2h (livello massimo di espressione della proteina). Nei tempi successivi si osservava una ulteriore diminuzione anch'essa graduale con livelli minimi a 72h e di molto al di sotto del valore calcolato per il campione non trattati (NT) (Fig. 46A, D).

Le cellule trattate con flunarizina 10 μ M erano soggette ad una forte diminuzione del livello delle PKC δ rispetto al valore del campione NT, questo fenomeno avveniva subito dopo 5 secondi e continuava fino a 1 minuto. Poi, l'espressione della proteina si riportava ai livelli del non controllo e si manteneva tale fino a 48h, tempo oltre il quale il suo valore diminuiva nuovamente fino a scomparire dopo 72h (Fig. 46B, D).

Quando veniva eseguito il co-trattamento, inizialmente si aveva un andamento della PKC δ perfettamente sovrapponibile a quello delle cellule trattate con il cisplatino da 5 secondi a 1 minuto. Diversamente da 5 minuti in poi l'espressione della proteina seguiva lo stesso trend documentato per le PC12 trattate con flunarizina (Fig. 46C, D).

L'effetto della flunarizina nei campioni co-trattati sembrava diretto all'eliminazione del secondo picco di espressione della proteina.

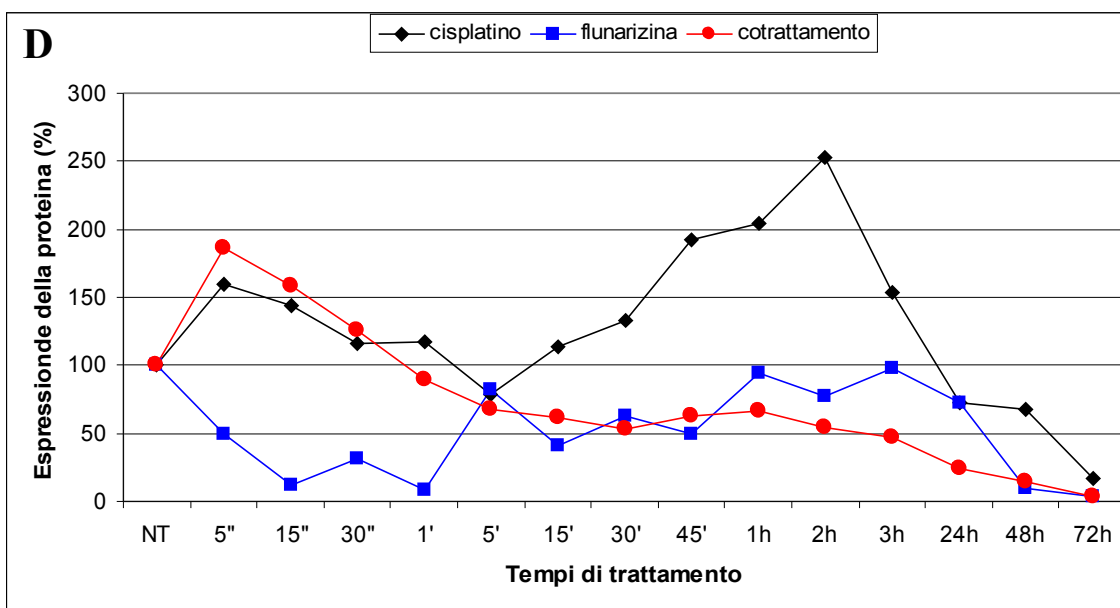
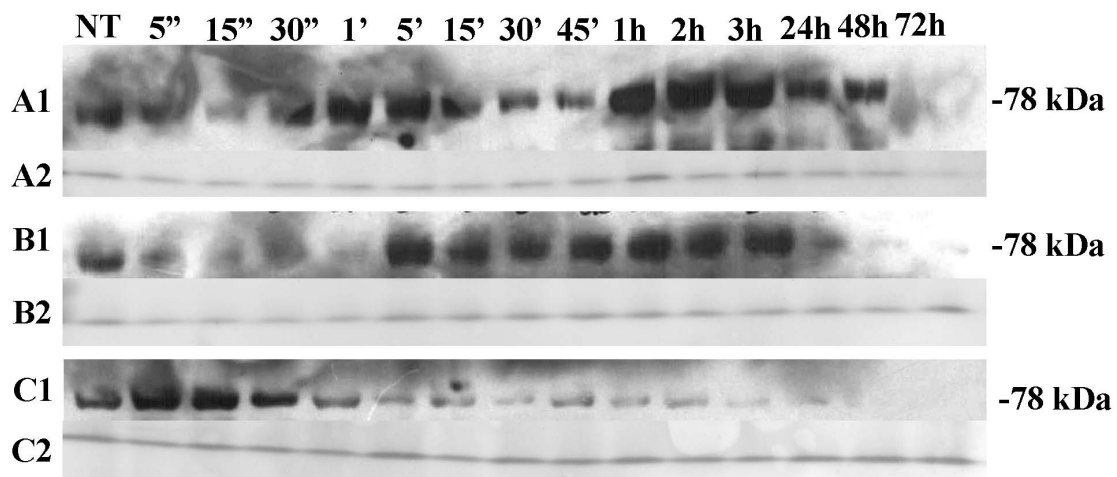


Figura 46: andamento dell'espressione della proteina PKC δ nel tempo in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M (A), flunarizina 10 μ M (B) o co-trattate (C). Le linee 1 rappresentano la proteina, le linee 2 sono i rispettivi ponceau. D: grafico della quantificazione delle bande. La quantità di proteina è espressa in percentuale rispetto al valore del non trattato (NT) che è stato assunto come il 100%.

3.2.5.5 14-3-3 β

Il trattamento con cisplatino 13 μ M induceva un aumento dell'espressione della proteina 14-3-3 β già dopo 30 secondi di esposizione con un picco massimo dopo 1 minuto per poi calare gradualmente e mantenersi ai livelli del campione non trattato (NT) (Fig. 47A, D).

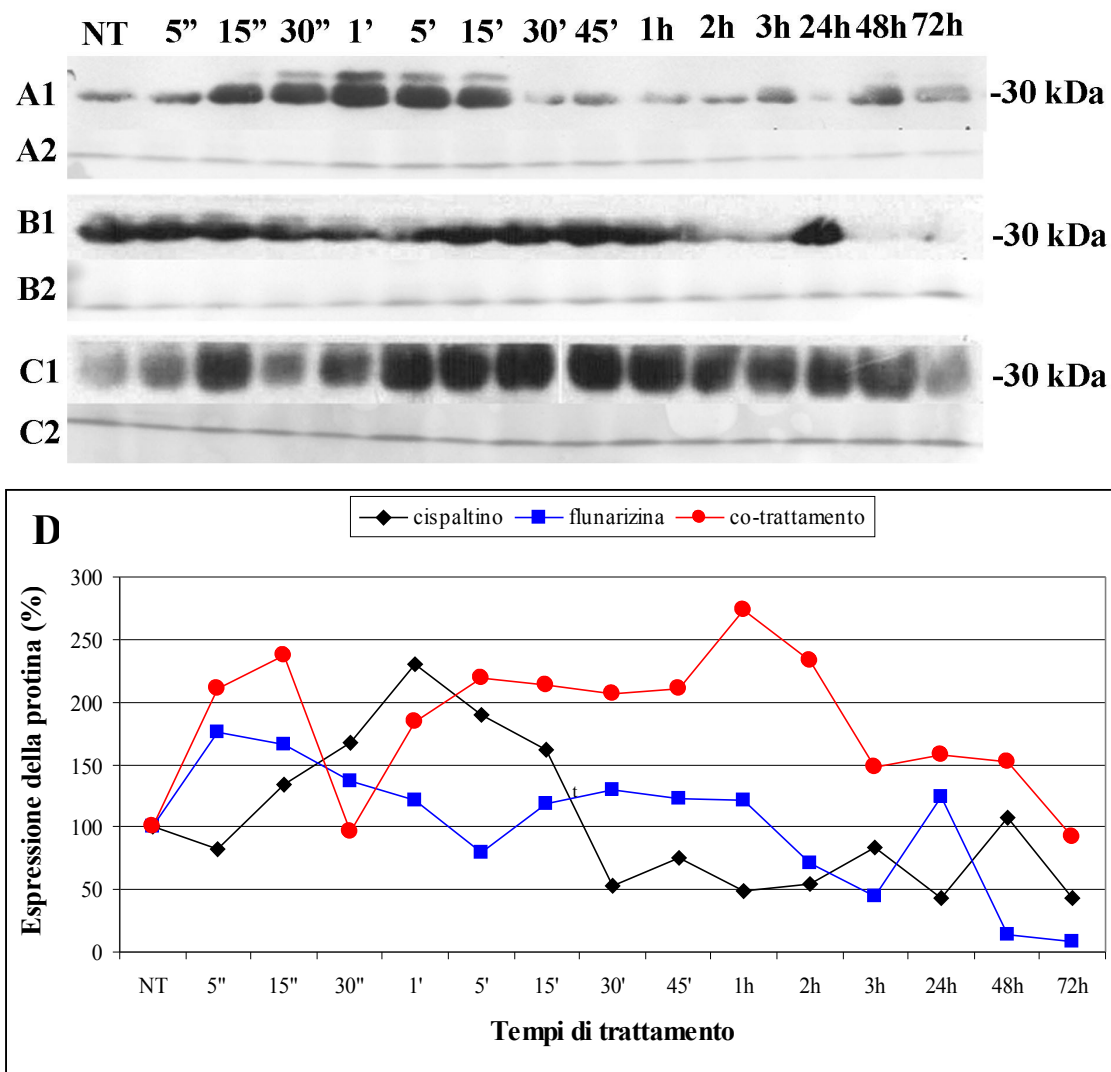


Figura 47: andamento dell'espressione della proteina 14-3-3 β nel tempo in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M (A), flunarizina 10 μ M (B) o co-trattate (C). Le linee 1 rappresentano la proteina, le linee 2 sono i rispettivi ponceau. D: grafico della quantificazione delle bande. La quantità di proteina è espressa in percentuale rispetto al valore del non trattato (NT) che è stato assunto come il 100%.

Le cellule trattate con la sola flunarizina, invece, variavano istantaneamente la produzione della proteina che raggiungeva alti livelli

dopo 5 secondi per poi riabbassarsi lentamente, restare più o meno costante nel tempo e scendere a livelli molto bassi dopo 48h (Fig. 47B, D).

Infine, nel co-trattamento si osservava un aumento dell'espressione delle 14-3-3 β subito dopo 5 secondi dall'aggiunta del cisplatino, con un picco di espressione a 15 secondi per poi calare in modo repentino a 30 secondi e risalire nuovamente con un ulteriore picco di espressione dopo 5 minuti raggiungendo i medesimi livelli osservati per il trattamento con il solo cisplatino. Il livello della proteina si manteneva ad alti valori fino a 2h per poi ridiscendere in modo graduale ma mantenendosi sempre a quantità superiori a quelli del NT fino a 72h dove l'espressione arrivava allo stesso livello del controllo (Fig. 47C, D).

Quindi la flunarizina nel suo meccanismo di protezione manteneva alti i livelli di espressione della 14-3-3- β per tempi molto più lunghi rispetto a quello che la cellula stessa riusciva a fare sotto lo stimolo apoptotico del cisplatino.

In figura 48 è stata documentata la localizzazione della proteina in cellule di controllo e altre trattate con il cisplatino 13 μ M ai tempi in cui era stata riscontrata una variazione della sua espressione.

Le immagini hanno mostrato come la 14-3-3 β nel non trattato era espressa a livello citoplasmatico ma localizzata in prossimità della membrana citoplasmatica. La sua intensità aumentava nei momenti di massima espressione (1 minuto) rimanendo nella stessa localizzazione per poi diventare più omogeneamente distribuita nel citoplasma quando il suo livello era estremamente ridotto (48h) (Fig. 48).

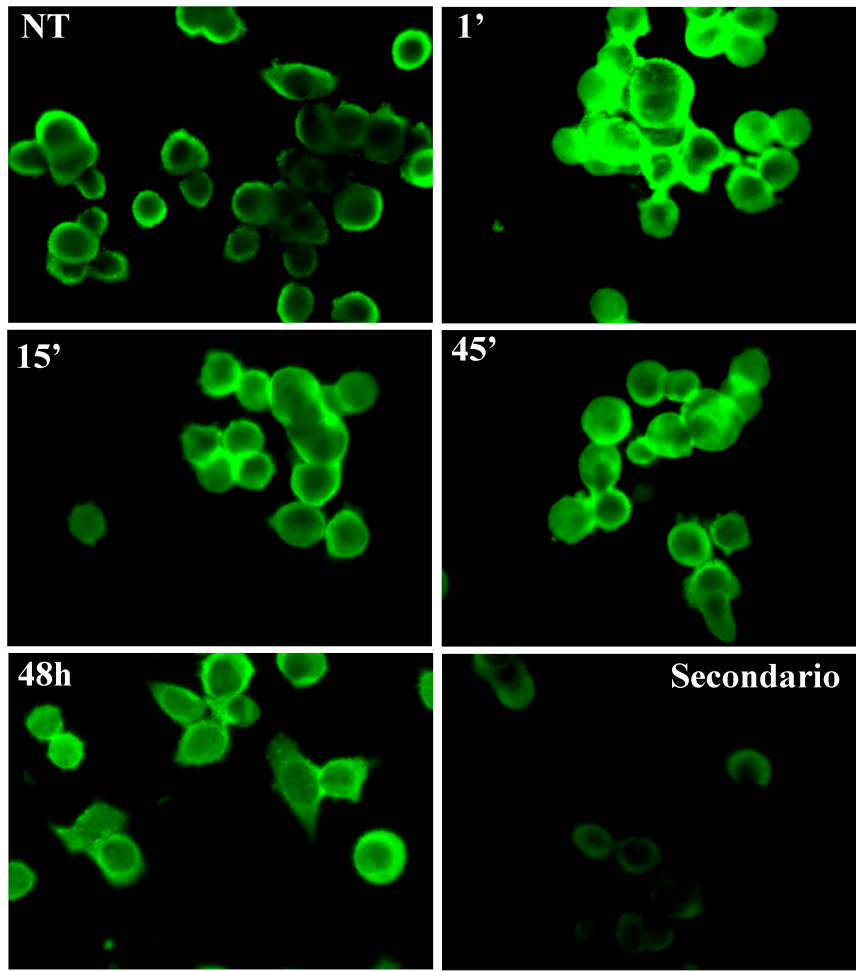


Figura 48: time course dell'espressione della 14-3-3 β in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M. In verde si nota la marcatura dovuta al secondario FITC. NT=non trattato. Ingrandimento 40X.

Il pre-trattamento con la flunarizina non alterava la localizzazione della proteina che restava associata alla membrana citoplasmatica anche nei momenti di massima espressione.

3.2.5.6 IL GAPDH

Nelle PC12 trattate con il cisplatino 13 μ M l'espressione della proteina GAPDH, si manteneva a livelli prossimi a quelli del campione non trattato (NT) fino a 2h di esposizione. Dopo 3h di trattamento il livello della proteina cominciava ad aumentare fino ad arrivare ad un picco massimo di espressione dopo 48h per poi calare leggermente dopo 72h (Fig. 49A, D).

Quando le cellule venivano trattate con flunarizina 10 μ M il GAPDH si manteneva a livelli di espressione paragonabili a quelli del controllo per tutti i tempi testati (Fig. 49B, D).

Durante il co-trattamento si ripeteva all'incirca il trend di espressione visto per la flunarizina. Quindi il pre-trattamento con il protettore comportava un annullamento completo dell'azione indotta dal cisplatino sull'espressione del GAPD (Fig. 49C, D).

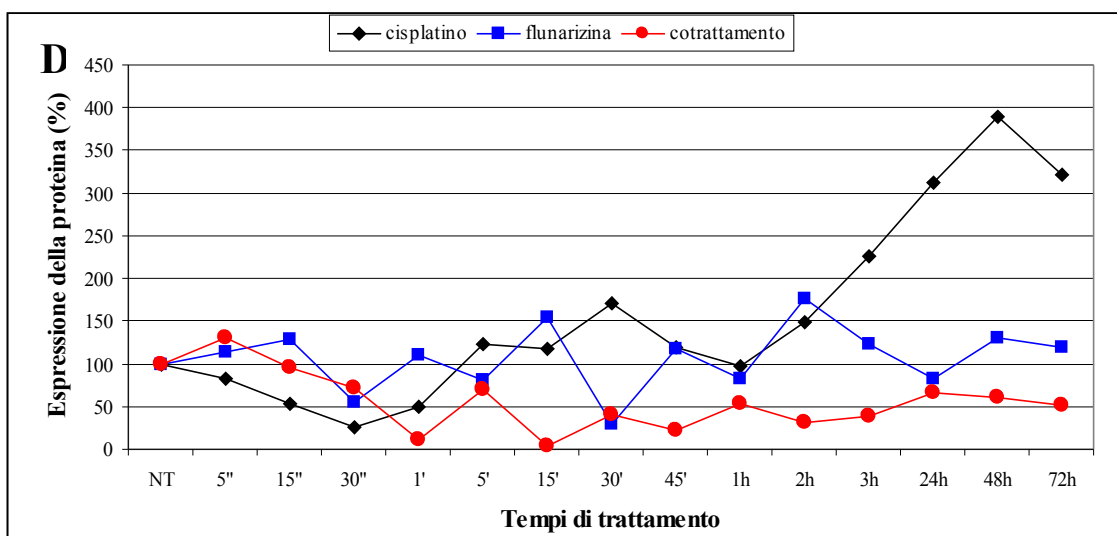
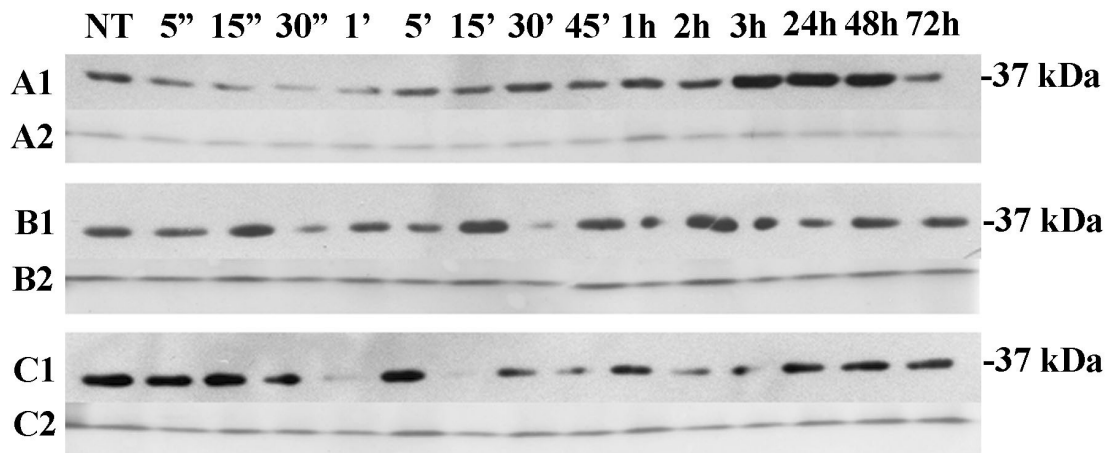


Figura 49: andamento dell'espressione della proteina GAPDH nel tempo in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M (A), flunarizina 10 μ M (B) o co-trattate (C). Le linee 1 rappresentano la proteina, le linee 2 sono i rispettivi ponceau. D: grafico della quantificazione delle bande. La quantità di proteina è espressa in percentuale rispetto al valore del non trattato (NT) che è stato assunto come il 100%.

L'indagine immunocitochimica ha evidenziato come la proteina era localizzata a livello citoplasmatico nel campione non trattato.

Dopo 3h di esposizione al cisplatino 13 μ M si osservava una marcatura più prossima al nucleo e in alcune cellule si notava una traslocazione a livello nucleare. Lo stesso fenomeno veniva documentato anche per i tempi successivi fino alle 72h, ma restava sempre limitato a poche cellule (Fig. 50).

Figura 50: time course dell'espressione della proteina GAPDH in PC12 trattate con cisplatino 13 μ M. In verde si nota la marcatura dovuta al secondario FITC. NT=non trattato. Le frecce indicano la marcatura a livello nucleare. Ingrandimento 40X

Nel trattamento con la flunarizina e nel co-trattamento la marcatura era sempre localizzata a livello citoplasmatico e non si osservava mai la traslocazione nel nucleo.

3.3 ESPERIMENTI SVOLTI SULLE PC12 DIFFERENZIATE

3.3.1 Studio della tossicità del cisplatino

Sulla base dei dati raccolti sulle PC12 indifferenziate è stata eseguita una indagine per valutare la tossicità del cisplatino sulle PC12 differenziate limitando il test alle concentrazioni 5-13-50-100 μ M per 24h. Un campione di cellule differenziate non trattate è stato utilizzato come controllo. La vitalità cellulare è stata analizzata con il metodo colorimetrico.

IL cis-DDP è risultato tossico per le PC12 differenziate già a partire dalla concentrazione più bassa (5 μ M). La sua azione era dose dipendente, infatti, induceva una riduzione della vitalità cellulare, rispetto al campione non trattato, che era maggiore al crescere della dose di cisplatino utilizzata. La vitalità cellulare veniva abbassata in modo significativo, del 40% alla dose 13 μ M ($P < 0,05$) e del 50% alla 50 μ M ($P < 0,05$) (Fig. 51).

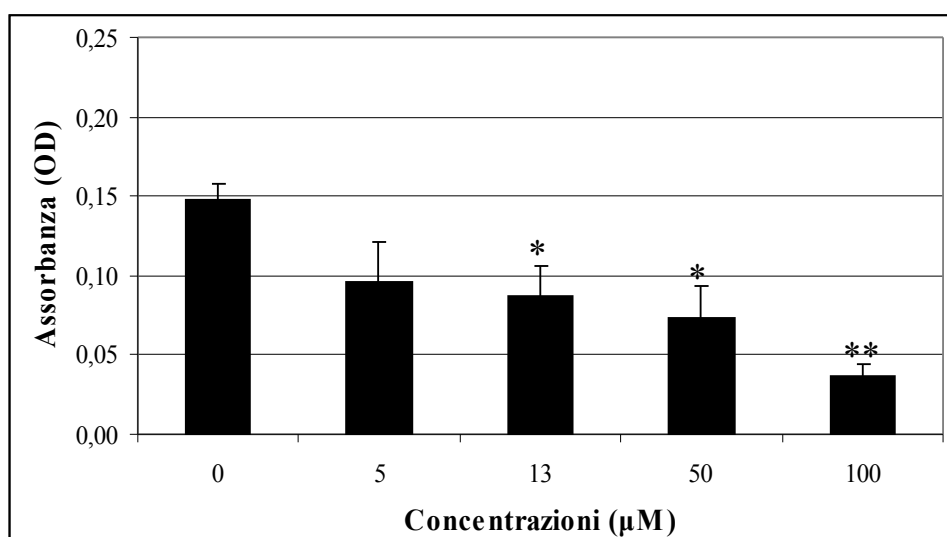


Figura 51: vitalità delle PC12 differenziate trattate con varie concentrazioni di cisplatino per 24h. Dati raccolti con il saggio colorimetrico con MTS. L'assorbanza è espressa come densità ottica (OD). *: significatività calcolata rapportando il dato di ogni concentrazione al valore del non trattato (0 μ M) (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

Dal punto di vista morfologico è stato osservato che, nel campione di controllo le PC12 differenziate in neuroni erano numerose e con prolungamenti lunghi con il citoscheletro ben mantenuto (colorato in rosso con falloidina) (Fig. 52A, B, C). Il trattamento con cisplatino causava una alterazione del citoscheletro osservabile dall'accorciamento dei neuriti, i corpi cellulari restavano integri ma le cellule perdevano la loro funzionalità. Questo fenomeno diventava evidente già alla dose di cis-DDP 13 μ M (Fig. 52D, E, F).

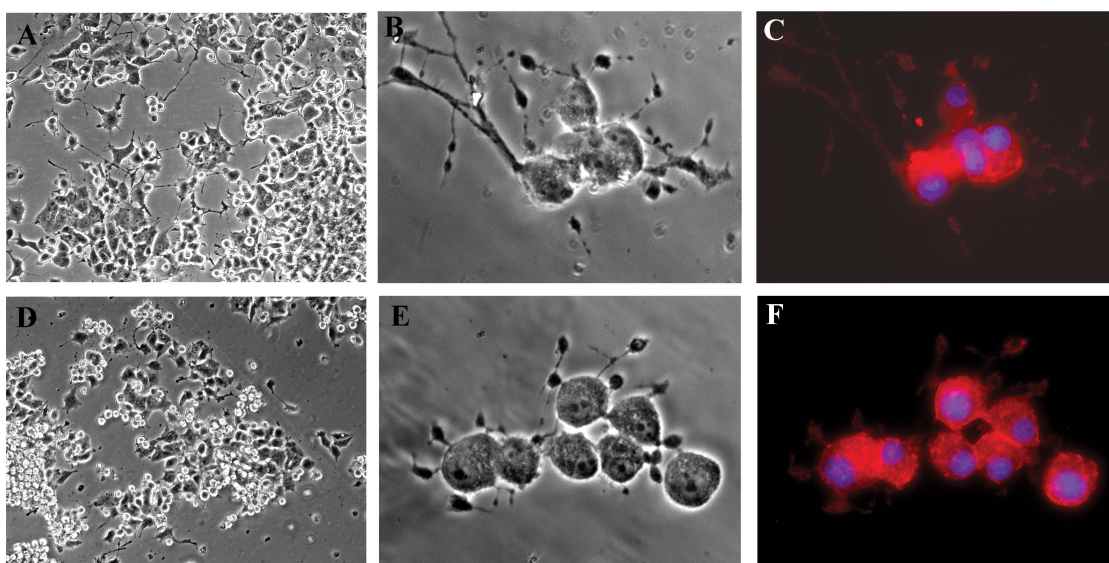


Figura 52: analisi dello stato del citoscheletro e dei nuclei su PC12 trattate con cisplatino 13 μ M per 24h. A, B, C: non trattato; D, E, F: trattati con cis-DDP 13 μ M. (A, B, D, E: immagini a contrasto di fase; C, F: color combine, in rosso la falloidina e in blu il DAPI). Ingrandimento 10X (A, D) e 60X (B, C, E, F).

3.3.2 Analisi della tossicità della flunarizina

Per valutare quale concentrazione di flunarizina era possibile utilizzare per eseguire le prove di protezione dal cisplatino è stata testata la sua tossicità alle concentrazioni 1-5-10 μ M per 24h. Anche in questo caso come controllo sono state utilizzate PC12 differenziate non trattate, inoltre, è stata valutata anche la eventuale tossicità del solvente della flunarizina (DMSO) alla concentrazione massima consentita (0,5%). Il DMSO 0,5% non ha mostrato tossicità (Fig. 53).

La flunarizina è risultata estremamente tossica per le cellule neuronali in quanto già alla dose 5 μ M si aveva una riduzione della vitalità, rispetto al controllo, del 56% ($P < 0,01$) contro il 4% alla concentrazione 1 μ M (Fig. 53).

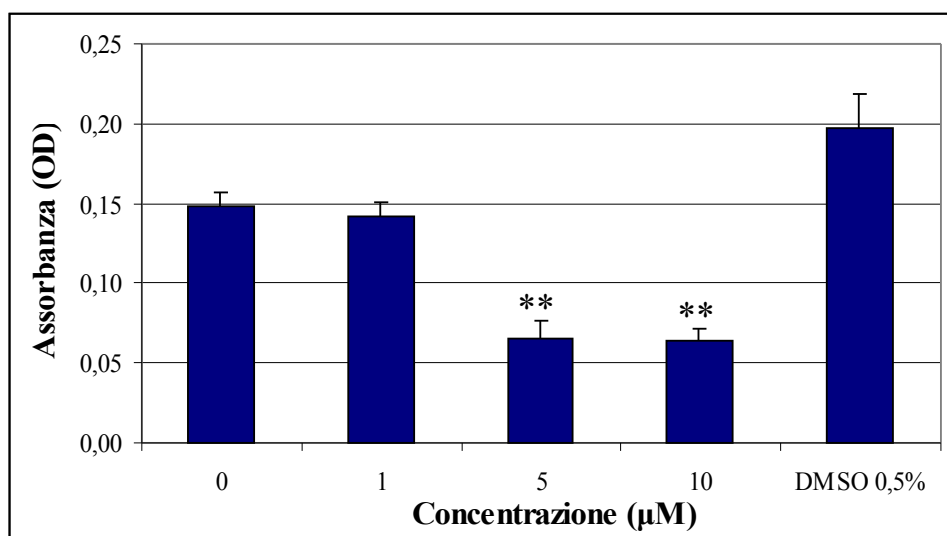


Figura 53: vitalità delle PC12 differenziate trattate con varie concentrazioni di flunarizina per 24h. Dati raccolti con il saggio colorimetrico con MTS. L'assorbanza è espressa come densità ottica (OD). *: significatività calcolata rapportando il dato di ogni concentrazione al valore del non trattato (0 μ M) (*: $P < 0,05$).

Valutando l'aspetto morfologico è stato documentato che le cellule non trattate presentavano dei lunghi e ramificati neuriti (Fig. 54A), il trattamento con flunarizina 1 μ M non alterava la morfologia delle cellule rispetto al controllo (Fig. 54B), invece, la dose di flunarizina 5 μ M determinava una perdita completa dei neuriti, inoltre, le cellule

presentavano delle vescicolazioni indice di una probabile morte per necrosi (Fig. 54C).

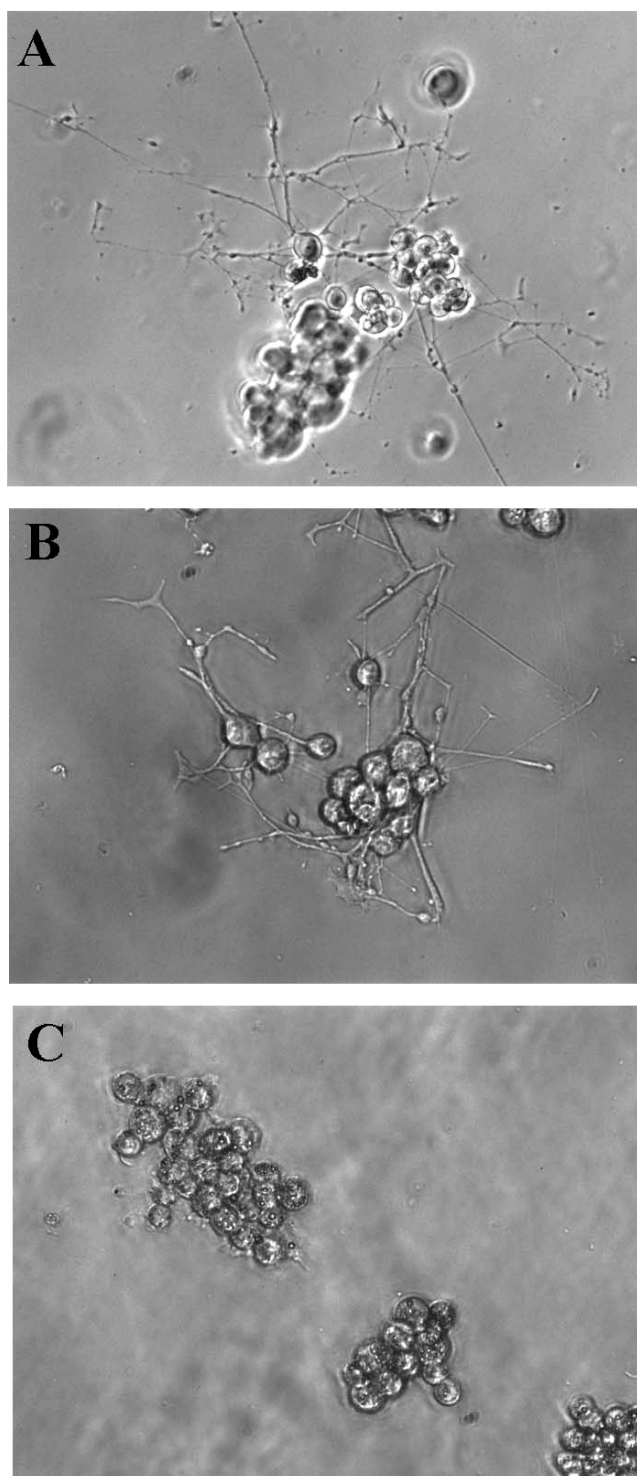


Figura 54: immagini a contrasto di fase di PC12 differenziate trattate con flunarizina. A: non trattate; B: trattate con flunarizina $1\mu\text{M}$ per 24h; C: trattate con flunarizina $5\mu\text{M}$ per 24h. Ingrandimento 10X.

Pertanto sulla base dei dati raccolti la concentrazione della flunarizina $1\mu\text{M}$ è risultata la dose massima utilizzabile per studi di protezione.

3.3.3 Studio della protezione dell'azione tossica del cisplatino

Le PC12 differenziate sono state pre-trattate per 30 minuti con flunarizina $1\mu\text{M}$ e in seguito trattate con cisplatino $5\mu\text{M}$ o $13\mu\text{M}$ o $50\mu\text{M}$ per 24h.

Dal co-trattamento è emerso che la flunarizina è in grado di proteggere i neuroni dall'azione tossica del cisplatino per tutte e tre le dosi testate. Confrontando i co-trattamenti con il dato di vitalità dei campioni trattati con la dose di cisplatino corrispondente, si osservava un recupero della vitalità pari al 22%, del 33% e dell'8% nei confronti rispettivamente del cisplatino $5\mu\text{M}$, $13\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$. Inoltre, il co-trattamento con flunarizina e cisplatino $13\mu\text{M}$ mostrava una vitalità molto vicina a quella del campione di controllo (Fig. 55).

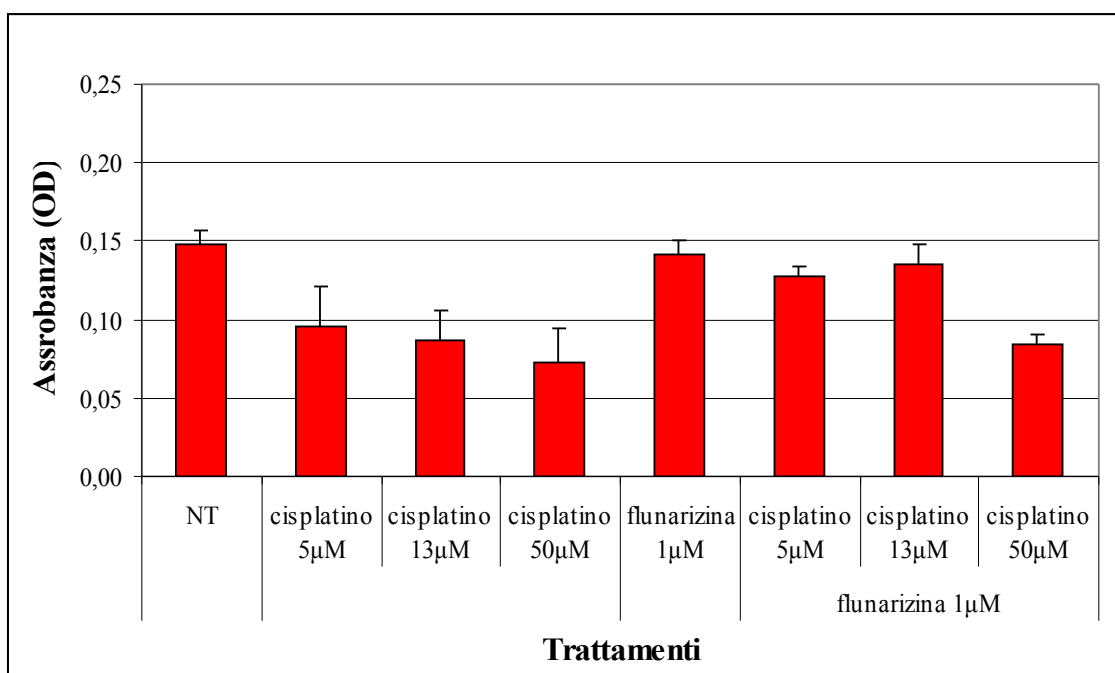


Figura 55: vitalità delle PC12 differenziate pre-trattate per 30 minuti con flunarizina $1\mu\text{M}$ e in seguito con cisplatino per 24h. Dati raccolti con il saggio colorimetrico con MTS. L'assorbanza è espressa come densità ottica (OD).

Per quanto riguardava la morfologia è stato osservato che la flunarizina nelle cellule co-trattate non era in grado di prevenire la perdita dei neuriti causata dal trattamento con cis-DDP (Fig. 56).

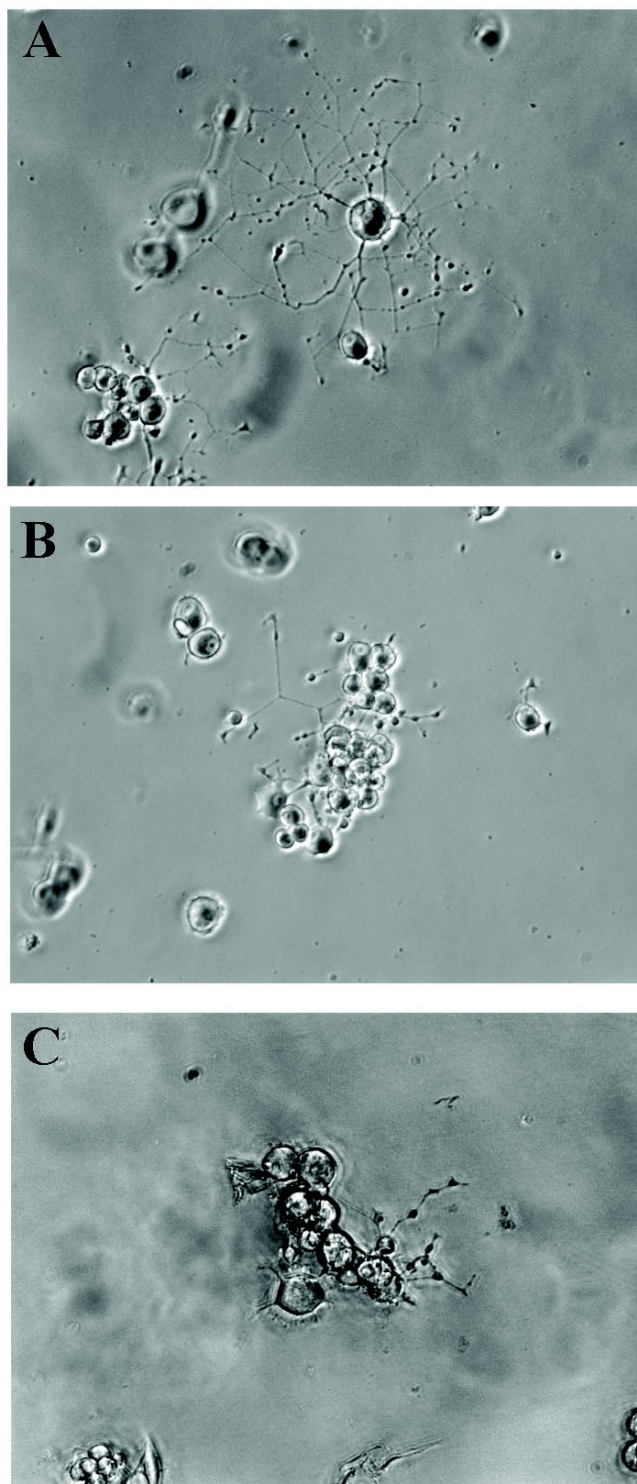


Figura 56: immagini a contrasto di fase di PC12 differenziate. A: non trattate; B: trattate con flunarizina 1 μ M per 24h; C: pre-trattate con flunarizina 1 μ M per 30 minuti e in seguito trattate con cisplatino 13 μ M per 24h. Ingrandimento 15X.

4 DISCUSSIONE

L'indebolimento dell'udito colpisce quasi 7 milioni di italiani, spesso è causato dalla perdita delle cellule sensoriali dell'organo del Corti (cellule cigliate e neuroni), a causa di vari fattori che generano stress ossidativo, fra questi sono compresi il rumore, le infezioni e i farmaci ototossici (amminoglicosidi e cisplatino). Nei mammiferi la perdita delle cellule cigliate risulta un evento cruciale poiché, a differenza dei rettili e degli uccelli, queste cellule non hanno capacità rigenerativa, sono prodotte solo durante lo sviluppo embrionale e non sono in grado di riformarsi se vengono perse dopo la nascita (Ruben, 1967). Da molto tempo vengono studiati metodi e sostanze che siano in grado di prevenire la perdita di queste cellule e di proteggerle dagli agenti ototossici (Wang et al., 2003b). Molti studi sull'ototossicità sono stati eseguiti *in vivo* ma la scoperta delle colture cellulari ha permesso di svolgere ricerche su cellule che rappresentano bene l'organo di interesse (Piga et al., 2005; Saito et al., 2003). In questa tesi sono state utilizzate due linee cellulari, le OC-k3 (cellule derivanti dall'orecchio interno di topo immortalizzato) per studiare la ototossicità e la protezione sulle cellule cigliate e le PC12 (cellule di feocromocitoma di ratto) indifferenziate e differenziate per eseguire le medesime ricerche sulla componente neuronale.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare in primis la tossicità del cisplatino sulle due linee cellulari e poi testare alcune sostanze protettive, indagando i meccanismi molecolari alla base della tossicità e della protezione.

4.1 TOSSICITÀ DEL CISPLATINO

Il cisplatino (cis-DDP) è un chemioterapico utilizzato in un ampio spettro di neoplasie (Eastman, 1991; Rosenberg 1999; Katzung 2006), ma è anche conosciuto per i suoi effetti ototossici e nefrotossici come danni collaterali alla cura antitumorale (Humes, 1999; Devarajan et al., 2002; Rademaker-Lakhai et al., 2006; Huang et al., 2007). Ricerche sia sull'uomo sia su animali hanno dimostrato che l'ototossicità del cisplatino risultava maggiore a carico delle cellule cigliate esterne del giro basale della coclea (Laurell & Bagger-Sjoback, 1991; Rybak et al., 1995, 1999; Kopke et al., 1997; Liu et al., 1998; Evans & Halliwell, 1999; Alam et al., 2000; Huang et al., 2000; Watanabe et al., 2001; Van Ruijven et al., 2005). Il cis-DDP danneggiava anche le cellule del ganglio spirale inducendo o la perdita della loro funzionalità o la morte (Rybak et al., 1995; Cardinaal et al., 2000; Van Ruijven et al., 2005).

Dai dati raccolti in questa tesi è stato confermato che su modelli *in vitro* il cisplatino aveva un effetto tossico dose e tempo dipendente (Lee et al., 1998; Wang et al., 2000; Bertolaso et al., 2001; Devarajan et al., 2002; Imandi et al., 2004; Amràn et al., 2005; Liu et al., 2008), e che induceva la morte cellulare per apoptosi (Forge, 1985; Vago et al., 1998; Alam et al., 2000; Pirvola et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Liu et al., 2008). La tossicità del cis-DDP è apparsa più o meno marcata in funzione della linea cellulare che veniva trattata, infatti, in questo studio le OC-k3 sono risultate molto più sensibili al chemioterapico rispetto alle PC12 indifferenziate in quanto a parità di concentrazione (13 μ M) le prime subivano una mortalità del 20% a 24h e del 40% a 48h, mentre per le seconde le percentuali erano minori (8% a 24h e 17% a 48h). Come documentato da Kim et al. (2000), la privazione del siero per le PC12 comportava la morte cellulare per apoptosi. In questa condizione le PC12 risultavano più sensibili all'azione

tossica dell'etanolo rispetto a quelle mantenute in terreno con il siero (Krzyzanski et al., 2007). Pertanto, nel nostro studio, per simulare un danno su cellule che non erano già state compromesse, le PC12 sono state mantenute in terreno completo prima del trattamento con cisplatino, in modo da isolarne l'effetto tossico, stesso tipo di procedimento utilizzato da vari altri ricercatori (Klein et al., 2007; Piga et al., 2007).

Le PC12 se trattate con NGF nell'arco di 6 giorni differenziano in neuroni simpatetici (Greene & Tischler, 1976; Tischler & Greene, 1978). L'eliminazione dell'NGF dopo il differenziamento comporta la morte cellulare per apoptosi (Green & Tischler, 1976; Batistatou & Green, 1991; Rukenstein et al., 1991; Mesner et al., 1992). Anche in questo caso come per le PC12 indifferenziate abbiamo eseguito il trattamento con il cisplatino senza eliminare l'NGF per valutare i danni causati esclusivamente dal chemioterapico (Klein et al., 2007). In letteratura è stato riportato che l'NGF proteggeva i neuroni ritardando l'apoptosi indotta dal cisplatino in modelli animali (Apfel et al., 1992) e cellulari (es: DRG e PC12 differenziate) (Koning et al., 1994; Jayadev, et al., 1995; Gill & Windebank, 1998; Mc Donald et al., 2005) ma in alcuni casi questo effetto non era stato documentato (Windebank et al., 1994). Nel nostro studio le PC12 differenziate sono risultate molto sensibili all'azione del cisplatino che dopo 24h a basse concentrazioni causava una mortalità già molto alta (circa il 40% per il cisplatino 13 μ M) e raggiungeva il 50% alla dose 50 μ M.

Come documentato da Previati et al. (2007) sulle OC-k3, il cisplatino per esplicare la sua azione apoptotica danneggiava il citoscheletro. Anche nel nostro caso sia le PC12 sia le OC-k3 sottoposte all'azione del farmaco subivano una disorganizzazione delle fibre di actina con conseguente cambiamento e restringimento della forma cellulare, la perdita del contatto cellula-cellula, il distacco e il passaggio in sospensione. Questo fenomeno si presentava già alla dose 13 μ M, l'effetto si aggravava con il passare del

tempo di esposizione al cisplatino e con l'aumento della sua concentrazione.

Sulle PC12 differenziate il cis-DDP agiva causando l'accorciamento e la perdita dei neuriti con conseguente perdita della funzionalità neuronale, già documentata sulle stesse cellule e su altre linee neuronali sia dopo trattamento con il chemioterapico (Koning et al., 1994; Quasthoff & Hartung, 2002), sia dopo privazione dell'NGF (Dispersyn et al., 1999).

Parallelamente al citoscheletro è stato indagato il danno a livello nucleare. Su varie linee cellulari in particolare sulle HL60 è stato dimostrato che l'apoptosi indotta da cisplatino causava la frammentazione del nucleo dando il tipico DNA ladder (Rauko et al., 2001; Cipak et al., 2003). Per entrambe le linee cellulari da noi studiate non è stata evidenziata nessuna frammentazione della cromatina nell'arco delle 48h di esposizione alle concentrazioni di cis-DDP oggetto di questo studio (13 μ M per le OC-k3, dalla 5 μ M alla 200 μ M per le PC12). Come noi, altri autori hanno documentato come la morte cellulare causata dall'esposizione al cisplatino avvenisse senza frammentazione della cromatina (Ormerod et al., 1994), in particolare per le OC-k3 questo fenomeno era già stato descritto da Previati et al. (2007) i quali avevano trattato le cellule con cisplatino 50 μ M per 24-48h.

Un marker tipico del processo apoptotico è l'esposizione della fosfatidilserina (PS) sulla membrana citoplasmatica evidenziabile con l'annessina-V (Böhm & Schild, 2003). Le PC12 e le OC-k3 mostravano una positività a questo marker già alla dose 13 μ M e all'aumentare della concentrazione di cisplatino si potevano anche osservare un principio di condensazione e marginalizzazione della cromatina e in casi rari la frammentazione del nucleo in corpi rotondenggianti.

Tutti questi eventi indicavano che il cisplatino sulle linee cellulari da noi studiate aveva un effetto tossico con induzione della morte cellulare per apoptosi ma senza che vi fosse frammentazione della cromatina.

La dose di cis-DDP $13\mu\text{M}$ è stata considerata quella ottimale per studi di protezione, in quanto era la concentrazione minima in grado di dare apoptosi, senza causare una mortalità pari o superiore al 50%. Le dosi superiori erano considerate troppo tossiche, infatti, per quelle pari e superiori alla $100\mu\text{M}$ molto probabilmente le cellule morivano per necrosi come documentato anche da altri autori su una linea cellulare epiteliale renale (LLC-PK1) (Imandi et al., 2004) o su un'altra linea cellulare derivante dall'orecchio interno di topo (HEI-OC1) (Devarajan et al., 2002).

Seppur limitandoci allo studio della vitalità e dei danni morfologici causati dal cisplatino, anche per le PC12 differenziate, la concentrazione $13\mu\text{M}$ è risultata quella limite per studi di protezione.

4.2 PROTETTORI

Anche se il meccanismo con il quale il cisplatino attua la sua azione tossica non è ancora ben chiarito, è risaputo che esso è in grado di formare complessi con il DNA bloccando la progressione del ciclo cellulare (Huang et al., 1995; Kharbanda et al., 1995; Jordan & Carmo-Fonseca, 2000; Kartalou & Essigmann, 2001) o di indurre la produzione di ROS riducendo gli antiossidanti cellulari (Clerici et al. 1995; Kopke et al., 1997; Evans & Halliwell, 1999; Rybak et al., 1999; Davies, 2000; Feghali et al., 2001; Teranishi et al., 2001). La fase finale dell'azione del cisplatino è di indurre la morte cellulare per apoptosi o necrosi. Il protettore ideale deve essere in grado di interagire con il cisplatino, bloccando la sua tossicità o inattivandolo o interferendo con il suo meccanismo d'azione.

4.2.1 Il *Ginkgo biloba*

Molte ricerche sono da tempo indirizzate verso l'utilizzo di sostanze antiossidanti come otoprotettori. Risultati positivi sono stati documentati sia *in vivo* su animali (Teranishi et al., 2001; Ekborn et al., 2002; Li et al., 2002; Teranishi & Nakashima, 2003) sia *in vitro* su espianti dell'ODC (Feghali et al., 2001) o su colture cellulari (Bertolaso et al., 2001; Astolfi et al., 2008).

In modelli animali sono state testate diverse sostanze ad azione antiossidante somministrate a livello locale, come la D- o la L-metionina (Ekborn et al., 2002; Li et al., 2002), il trolox (Teranishi & Nakashima, 2003) e la tiourea (Ekborn et al., 2003) le quali si sono dimostrate in grado di proteggere l'ODC dalla perdita delle cellule cigliate esterne e/o della acutezza uditiva prodotta dal cisplatino. Inoltre, la D-metionina, così come il DDTC (diethylditiocarbonato) e di MTBA (acido-4-metilbenzoico) proteggono dalla riduzione del glutatione, dalla diminuzione dell'attività

degli enzimi antiossidanti e dall'aumento della perossidazione lipidica (Rybak et al., 2000; Campbell et al., 2003). Berolaso et al. (2001) hanno dimostrato che sulle OC-k3, sostanze come N-acetilcisteina, il GSH e la vitamina C, prevenivano la morte cellulare indotta dal cisplatino, indicando che la formazione di ROS esplicava un ruolo fondamentale nella sua azione tossica. L'effetto protettivo della N-acetilcisteina è stato documentato anche sui neuroni uditivi in colture organotipiche di espunti cocleari (Feghali et al., 2001).

L'estratto vegetale del *Ginkgo biloba* (EGb 761) è conosciuto per le sue capacità antiossidanti e i suoi molteplici effetti benefici, ma viene in particolar modo studiato nella prevenzione e la cura di patologie neurologiche come l'Alzheimer (Bastianetto et al., 2000a, 2000b; Zhou & Zhu, 2000; Chen et al., 2003; Kang et al., 2007). Alcune ricerche sono state eseguite anche nei confronti dell'azione ototossica del cisplatino. Sono tutti lavori *in vivo* nei quali veniva dimostrata che la otoprotezione dell'EGb 761 si esplicava attraverso la sua capacità di scavenger dei radicali liberi dell'ossigeno e di ridurre la perossidazione lipidica diminuendo la tossicità del cis-DDP senza alterarne la capacità antitumorale (Rybak et al., 1999; Xu et al., 2004; Wang et al., 2006; Huang et al., 2007).

Non sono mai stati eseguiti studi di protezione *in vitro* con l'estratto di *G. biloba*, su linee cellulari dell'orecchio interno, l'unico lavoro è stato pubblicato sui dati raccolti in questa tesi di dottorato (Astolfi et al., 2008). Dopo aver valutato che l'estratto del *Ginkgo biloba* (ginkgoselect) non era tossico per le OC-k3 abbiamo documentato che la sua capacità protettiva, si esplicava nei confronti del cisplatino 13 μ M e non per dosi più elevate. Come Kang et al. (2007) hanno dimostrato che il EGb 761 proteggeva le PC12 dal trattamento con Paraquat in maniera dose e tempo dipendente anche il ginkgoselect (ginkgo) da noi testato difendeva le cellule dal cisplatino nella medesima maniera. L'effetto massimo veniva raggiunto alla dose di 150 μ g/ml e si attuava solo dopo 48h dal trattamento con il

chemioterapico. Il pre-trattamento con il ginkgo è risultato più efficace se protratto per 24h prima dell'aggiunta del cisplatino. La protezione è stata provata sia dalla diminuzione della mortalità del 22,5% sia da una riduzione del processo apoptotico data dalla mancata esposizione della PS nei campioni co-trattati e dal mantenimento dello stato del citoscheletro che era paragonabile con quello delle cellule che non avevano subito nessun tipo di trattamento.

Abbiamo, inoltre, osservato che l'estratto del *G. biloba* per avere un effetto protettivo sul c doveva essere presente nel terreno al momento della somministrazione del chemioterapico. Probabilmente il ginkgoselect è in grado di bloccare la tossicità del cis-DDP o interagendo direttamente con esso o bloccando la sua entrata dentro la cellula o operando su altri meccanismi, tipo la produzione di ROS, che al momento non sono ancora stati da noi indagati.

4.2.2. La Flunarizina

La flunarizina è il secondo protettore utilizzato nel nostro studio; è un farmaco calcio antagonista utilizzato per la cura delle emicranie (Spierings, 1998; Katzung, 2006) e dell'epilessia (Greenberg et al., 1987) ma viene anche usato per trattare malattie dell'apparato uditivo, come le vertigini (Olesen et al., 1988), il tinnito (Murai et al., 1992) e la malattia di Meenièr (Thai-Van et al., 2001).

La regolazione dell'omeostasi del calcio è alla base di vari processi cellulari, per esempio per le cellule cigliate e i neuroni dell'ODC questa funzione è importantissima per la trasduzione e trasmissione del segnale sonoro (Blanchet et al., 1996; Dulon et al., 1998; Yamoah et al., 1998).

In molti studi è stato documentato che lo ione calcio (Ca^{2+}) è un secondo messaggero implicato nel processo apoptotico (McConkey & Orrenius, 1995; Rizzuto et al., 2003). Variazioni della concentrazione del

Ca^{2+} a livello citosolico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) e dei serbatoi cellulari (reticolo endoplasmatico e mitocondrio) segnano il destino della cellula (Cerella et al., 2007). Un aumento sostenuto della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ causata da vari tipi di insulti è considerato essere il maggior meccanismo inducente la morte per apoptosi o necrosi delle cellule nervose (Meldrum & Garthwaite, 1990; Nicotera et al., 1992; Lipton & Rosenberg, 1994; Dowd, 1995; Trump & Berezsky, 1995). Il cisplatino nella sua azione tossica causa un aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Dulon et al., 1991) anche se il meccanismo d'azione non è ben conosciuto. L'uso di farmaci calcio antagonisti, è oggetto di studi volti a bloccare o prevenire la morte cellulare neuronale per apoptosi, in particolare nei riguardi della privazione di fattori trofici come l'NGF (Dyckhoff et al., 1999).

So et al. (2005, 2006, 2008) hanno studiato la possibilità di utilizzare la flunarizina per proteggere le cellule cigliate dell'ODC dall'apoptosi indotta dal cisplatino, sia in colture cellulari (HEI-OC1) sia in colture primarie. Nel nostro studio sono state eseguite prove di protezione nei confronti sia delle PC12 indifferenziate sia differenziate, in quanto in letteratura non era mai stata studiata la possibilità di utilizzare la flunarizina per proteggere i neuroni dalla tossicità indotta dal cisplatino.

I test di tossicità ci sono serviti per valutare quale fosse la dose massima di farmaco da utilizzare nelle prove di protezione. La flunarizina è risultata tossica per le PC12 indifferenziate a concentrazioni pari e superiori alla $20\mu\text{M}$ sia a 24h sia a 48h di trattamento. La dose utilizzata nei co-trattamenti è stata la $10\mu\text{M}$ alla quale la vitalità si manteneva a livelli paragonabili al non trattato e non si notavano né alterazioni del citoscheletro né induzione dell'apoptosi.

Nel caso delle PC12 differenziate il farmaco è risultato molto più tossico, tanto da causare una mortalità del 56% già alla dose $5\mu\text{M}$ dopo 24h di trattamento, in questo caso la concentrazione ideale per studi di protezione è risultata essere la $1\mu\text{M}$, la stessa utilizzata da Schierle &

Brundin (1999) su culture neuronali embrionali per valutare la protezione dal danno indotto dalla privazione del siero.

Dal co-trattamento flunarizina 10 μ M e cisplatino 13 μ M abbiamo osservato che le PC12 indifferenziate venivano preservate dal danno del chemioterapico in quanto erano mantenute alle condizioni del controllo sia per quanto riguardava la vitalità sia per l'analisi dell'esposizione dell'annessina-V e dello stato del citoscheletro. Questi dati concordavano con quelli ottenuti da So et al. (2005) i quali sulle HEI-OC1 hanno documentato la protezione della flunarizina 10 μ M nei confronti del cisplatino 20 μ M. Anche nelle prove di co-trattamento con cis-DDP 50 μ M abbiamo osservato un aumento della vitalità delle PC12 indifferenziate ma in questo caso la mortalità cellulare restava ancora alta e l'apoptosi non veniva bloccata.

Da questi dati risultava che la flunarizina sembrava in grado di ritardare l'effetto tossico del chemioterapico. Nei confronti del cisplatino 13 μ M la protezione era totale probabilmente perché questa dose induceva nelle cellule un danno ancora recuperabile. Invece, il cis-DDP 50 μ M essendo molto più tossico non permetteva alle cellule di riparare completamente il danno e quindi esse andavano comunque incontro a morte per apoptosi pur essendone ritardato l'effetto.

Anche per le PC12 differenziate la flunarizina è risultata protettiva e il recupero massimo si osservava nei confronti della dose di cisplatino 13 μ M. Come documentato da Dyspersin et al. (1999) nelle PC12 alle quali veniva indotta la morte cellulare per privazione dell'NGF, la protezione della flunarizina si esplicava con un aumento della vitalità neuronale, mentre le indagini sullo stato del citoscheletro hanno evidenziato che il protettore non era in grado di preservare dalla perdita dei neuriti. Secondo Dyspersin et al., 1999 la morte cellulare e la perdita di neuriti erano due eventi indipendenti e separati nel tempo. La flunarizina sarebbe in grado di proteggere le cellule dall'apoptosi modulando il livello di calcio intracellulare agendo sui

serbatoi intracelulari (mitocondrio e reticolo endoplasmatico) o influenzando la permeabilità di membrana (Rich & Hollowell, 1990; Dyspersin et al., 1999).

Il meccanismo con il quale la flunarizina protegge dal danno apoptotico sia *in vivo* sia *in vitro*, non è ancora stato ben chiarito. Viene considerata una molecola multipotente per il fatto che oltre alla sua azione calcio antagonista agisce con altri meccanismi che le attribuiscono la capacità di interferire in diversi stadi, sia dell'apoptosi sia della necrosi (Takei et al., 1994; Elimadi et al., 1998).

Tra le tante proprietà farmacologiche della flunarizina una di quelle che potrebbe essere considerata efficace nei confronti del cisplatino è la capacità di indurre il rilascio del calcio legato alle membrane prevenendo la riorganizzazione lipidica, influenzando di conseguenza sulla transizione di fase della fosfatidil serina (PS) a cui seguirebbe la rottura della membrana, (Thomas & Verkleij, 1990; Vogelgesang & Scheuffler, 1990; Eichler et al., 1994; Vogelgesang et al., 1988) o la formazione del blebbing (Thomas et al., 1988). Questa sua capacità spiegherebbe perché nelle PC12 indifferenziate pre-trattate con la flunarizina 10 μ M venisse quasi del tutto eliminata la esposizione della PS dopo trattamento con cis-DDP 13 μ M.

Molti ricercatori sostengono che la protezione della flunarizina dall'apoptosi sia calcio indipendente. So et al. (2005, 2006, 2008), infatti, descrivono come l'azione otoprotettiva della flunarizina sul cisplatino si attua con aumento della concentrazione di calcio citoplasmatico, e con la riduzione della perossidazione lipidica. Eichler et al. (1994), riportano risultati simili sui DRG (Dorsal Root Ganglion) trattati con flunarizina dopo privazione del siero. Da altri studi è emerso che essa sia in grado di agire direttamente sul mitocondrio o sulla perossidazione lipidica (Elimadi et al., 1998; Takei et al., 1994).

4.3 FLUNARIZINA vs CISPLATINO: PROTEINE COINVOLTE

Il meccanismo molecolare con il quale il cisplatino attua la sua azione tossica è soggetto a molte opinioni contrastanti, così come quello relativo alle modalità di protezione della flunarizina, per questo motivo si è cercato di svolgere delle indagini sulle PC12 indifferenziate per capire in che modo questi due farmaci agivano se somministrati separatamente o nel co-trattamento.

La maggior parte dei lavori riguardanti il pathway apoptotico indotto dal trattamento con cisplatino riferiscono del coinvolgimento delle proteine della famiglia MAPK (ERK1/2, JNK, p38) sia su varie tipologie cellulari (Persons et al., 1999; Wang et al., 2000; Mansouri et al., 2003; Choi et al., 2004; Amràn et al., 2005), sia da studi *in vivo* e *in vitro* sull'organo del Corti (Devarajan et al., 2002, Wang et al., 2003a; Previati et al., 2007; So et al., 2008). L'attivazione di queste proteine potrebbe causare la fosforilazione della p53, l'attivazione della caspasi-3 e la generazione di domini catalitici di alcuni isozimi delle PKC (- δ , - ϵ , - ζ) con induzione della morte cellulare (Fuchs et al., 1998; Basu et al., 2001). Gli stessi ROS che si formano dopo trattamento con cisplatino possono promuovere la permeabilizzazione del mitocondrio (Lemasters, 1999), attivare la p53 (Chandel et al., 2000), il rilascio del citocromo-C (Reed, 1997) e le caspasi (Higuchi et al., 1998).

Diversi studi hanno evidenziato come il cis-DDP era in grado di up-regolare le proteine Fas e FasL (Fulda et al., 1997; Mansouri et al., 2003). Infatti, Mansouri et al 2003 hanno osservato che la chiave determinante per l'apoptosi indotta dal cisplatino era l'attivazione sostenuta e prolungata sia di JNK sia di p38, ciò era correlato con una conseguente fosforilazione di

AP-1 che promuoveva un aumento della produzione del FAS-ligando con successiva attivazione della caspasi-3 e in seguito esecuzione dell'apoptosi.

Secondo Devarajan et al. (2002), la tossicità del cisplatino sulle HEI-OC1 era associata con un aumento dell'attività della caspasi-8 seguita dalla formazione di t-Bid, la traslocazione di Bax sul mitocondrio, il rilascio del citocromo-C e l'attivazione della caspasi-9. Uno dei maggiori target per l'azione del cis-DDP su cellule tumorali risultava essere il mitocondrio (Evans & Simpkins, 1998; Henkels & Turchi, 1999).

Quindi secondo i dati riportati in letteratura nel pathway apoptotico del cisplatino verrebbero attivate entrambe le vie, recettoriale e mitocondriale. In alcuni casi è stato documentato che il chemioterapico induce apoptosi in maniera caspasi indipendente (Nowak, 2000, Previati et al., 2007.)

Nel nostro lavoro non è mai stata osservata l'attivazione né delle ERK1/2 e nemmeno del JNK. Tutte le pubblicazioni che riportavano di questa attivazione erano lavori effettuati con dosi di cisplatino molto più alte di quella utilizzata in questa tesi e su linee differenti dalle PC12. Per esempio Wang et al. (2000) hanno documentato l'attivazione delle ERK e del JNK in HL60 dopo circa 12h di trattamento con cis-DDP 30 μ M. In cellule di glioma umano (A172) Choi et al. (2004) osservarono l'attivazione delle ERK dopo 1h di trattamento ma con dosi di cisplatino molto elevate (300 μ M). Lu & Cederbaum (2007) invece, dopo esposizione delle E47 al cisplatino 250 μ M osservarono la fosforilazione delle ERK dopo 16h ma mai quella del JNK. Questa variabilità di risultati sta ad indicare come il cisplatino possa indurre risposte differenti in funzione della concentrazione di utilizzo e della linea cellulare in esame. Nel caso delle PC12 da noi trattate con cisplatino 13 μ M la mancata fosforilazione di queste MAPK potrebbe indicare che alle condizioni sperimentali da noi utilizzate la morte cellulare non era mediata dall'attivazione di queste proteine.

Oltre alle MAPK sono state analizzate anche le proteinchinasi-C (PKC), le 14-3-3 β e il GAPDH.

Le PKC sono proteine il cui coinvolgimento nel processo apoptotico risulta abbastanza controverso, alcune isoforme appartenenti a questa famiglia sono considerate pro-apoptotiche (es: $-\alpha$ e $-\zeta$), altre invece risultano anti-apoptotiche (es: $-\delta$) (Deacon et al., 1997; Dempsey et al., 2000).

I dati da noi raccolti evidenziano come dopo trattamento con il cisplatino 13 μ M l'espressione delle tre isoforme analizzate (α , ζ e δ) avevano andamenti bifasici ma con tempistiche differenti. Sia per la PKC α sia per la δ si osservava un aumento della proteina già entro 5 secondi dal trattamento, ma il livello della PKC α rimaneva alta per lungo tempo (fino a 2h) quello della isoforma δ diminuiva già dopo 5 minuti per poi raggiungere un secondo picco di espressione dopo 2h e calare ancora in modo repentino. La PKC ζ invece aveva una risposta più lenta e più tardiva, cresceva lentamente fino a 15 minuti per poi restare ad alti livelli di espressione fino a 24h. La sovra-espressione delle PKC è stata considerata da alcuni ricercatori come pro-apoptotica (Reynald et al., 2000), al contrario, altri la consideravano una forma di protezione solo per le isoforme α e ζ (Frutos et al., 1999; Leverrier et al., 2002)

Questa differenza di espressione delle tre proteine poteva essere determinata da più fattori, primo fra tutti la modalità della loro attivazione che è strettamente legata sia ai loro co-fattori (il calcio, il diacil glicerolo e la PS) sia alla loro localizzazione.

I picchi di espressione delle PKC potrebbero essere legati al fenomeno descritto da Cerella et al. (2007). Essi hanno documentato che dal momento dell'arrivo di uno stimolo apoptotico le cellule rispondevano con variazioni della $[Ca^{2+}]_c$, inizialmente si aveva un aumento che causava una condizione di standby con effetto anti-apoptotico durante il quale la cellula cercava di rispondere all'insulto riparando il danno. Seguiva una riduzione della

concentrazione di calcio che determina la decisione di andare in apoptosi che diventava definitiva e irreversibile con un ulteriore aumento del $[Ca^{2+}]_c$.

Questo fenomeno potrebbe influenzare in particolare, la PKC α , che essendo una PKC ζ che necessita di calcio per l'attivazione è in grado di rispondere molto più prontamente alle variazioni della concentrazione di calcio nel citoplasma.

Il picco di espressione precoce della PKC α e la graduale attivazione alla membrana osservata fino ad 1h a cui seguiva il suo successivo ritorno a livello citosolico seguirebbe il primo aumento della $[Ca^{2+}]_c$, il secondo picco più tardivo, potrebbe essere associato al secondo aumento della concentrazione dello ione nel citoplasma. I picchi precoci delle PKC α e δ potrebbero essere considerati protettivi, così come la risposta più tardiva della ζ che invece si localizzava principalmente in prossimità del nucleo con un punto massimo a 3h e osservabile fino a 72h. La PKC δ fa parte della famiglia di protein chinasi nuove che non necessitano di calcio per essere attivate, mentre la isoforma ζ appartiene alla famiglia delle atipiche la cui attivazione dipende esclusivamente della PS (Poweel et al., 1996), questo spiegherebbe la risposta tardiva della PKC ζ . La cellula potrebbe attivare in modo tardivo la isoforma ζ come secondo tentativo di protezione, per supplire alla diminuzione della PKC α , infatti i due andamenti dell'espressione erano abbastanza complementari.

Con il passare del tempo, e il persistere dello stimolo apoptotico indotto dal cisplatino la cellula che probabilmente non era più in grado di riparare il danno, cominciava a produrre nuovamente la PKC δ dando il secondo picco. Il calo osservato dopo 2h potrebbe essere legato al taglio della proteina in frammenti altamente catalitici operato dalla caspasi-3 (Basu & Akkaraju, 1999; Basu et al., 2001). La fosforilazione di questa isoforma è considerata l'interruttore tra la sua attività anti- e pro-apoptica in quanto il taglio ad opera delle caspasi avviene solo sulla forma fosforilata (Brodie & Blumberg, 2003). La PKC δ tagliata è stata

considerata responsabile dell'aumento del meccanismo a "flip-flop" in cellule Jurkat trattate con cisplatino (Frasch et al., 2000). Questo coinciderebbe con il fatto che già dopo 24h di trattamento con il cisplatino 13 μ M le PC12 esponevano la PS. Anche la PKC ζ calava dopo 24h probabilmente per azione delle caspasi ma in questo caso il taglio induceva una inattivazione della proteina (Frutos et al., 1999). La migrazione della isoforma ζ a livello nucleare potrebbe indicare o l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione o il suo taglio operato dalla caspasi-3. Il meccanismo di esposizione della fosfatidilserina sulla membrana citoplasmatica potrebbe anche impedire l'attivazione della delle tre isoforme.

Quindi possiamo supporre che la cellula in risposta all'insulto con cisplatino attivava inizialmente la PKC α e la δ come difesa, e in modo più tardivo interveniva l'isoforma ζ . Dopo un primo tentativo di protezione la cellula cominciava a produrre segnali pro-apoptotici promuovendo l'espressione della PKC δ . Il bilancio-tra segnali pro- e anti-apoptotici decideva il destino delle PC12. La necessità da parte della cellula di utilizzare differenti protein chinasi derivava probabilmente dalla necessità di fosforilare o defosforilare contemporaneamente substrati diversi o con localizzazioni cellulari differenti allo scopo di ottenere una risposta più completa.

Il trattamento con la flunarizina non aveva dato grosse variazioni nell'espressione delle tre isoforme di PKC se non nel caso della PKC δ che veniva sempre mantenuta a livelli di espressione molto bassi.

Quando veniva eseguito il co-trattamento la flunarizina modificava l'espressione delle tre isoforme rispetto a quello osservato per il cisplatino. La PKC ζ restava sempre a livelli uguali a quelli del controllo, l'isoforma α calava dopo un picco iniziale probabilmente causato dall'aumento di calcio intracellulare indotto dal trattamento con cisplatino. Invece, il primo picco della PKC δ non veniva alterato, mentre il secondo era completamente annullato.

L'effetto protettivo della flunarizina non implicava l'attivazione di protein chinasi tipicamente anti-apoptotiche, probabilmente perché essendo un farmaco bloccante l'entrata di ioni calcio nella cellula, riduceva l'attivazione di queste proteine, come è stato documentato con l'indagine immunostochimica. Il cisplatino causava comunque una risposta iniziale probabilmente stimolando il rilascio di calcio dai serbatoi cellulari, la cellula rispondeva attivando le PKC con funzione protettiva che poi venivano completamente inibite nel tempo dalla flunarizina, probabilmente bloccando la liberazione di calcio dai serbatoi cellulari o perché la flunarizina attivava sistemi di protezione diversi.

Interessante è il fatto che il primo picco della PKC δ rimaneva uguale sia nel trattato con cisplatino sia nei co-trattati. Probabilmente la cellula induceva una sua istantanea attivazione con funzione protettiva, già documentata sulle PC12 private dal siero (Wert & Palfrey, 2000). Il secondo picco che veniva completamente eliminato dalla flunarizina, era legato probabilmente ad un segnale pro-apoptotico.

Le 14-3-3 β sono considerate proteine pro-apoptotiche (Van der Hoeven, 2000; Xiang et al., 2000; Sunayama et al., 2005, Su et al., 2008). Fu et al. (2000) sostenevano che la loro funzione era strettamente regolata dal loro livello di espressione e che probabilmente le proteine della famiglia 14-3-3 fungevano da fattori di sopravvivenza generici con la funzione di aumentare i segnali pro-sopravvivenza e sopprimere il pathway apoptotico, grazie alla loro capacità di legare molte varietà di molecole inattivandole e rendendole quindi incapaci di esplicare il loro ruolo pro-apoptotico. Tra le molteplici molecole con le quali possono interagire sono state inserite anche le PKC (Meller et al., 1996; Hausser et al., 1999)

Molti ricercatori sostengono che una sovra-espressione delle 14-3-3 sia un fattore anti-apoptotico (Chan et al., 1999; Zhang et al., 1999; Xing et al., 2000; Masters & Fu, 2001; Chen et al., 2006).

Su et al. 2008) hanno documentato che le PC12 sottoposte ad uno stress ossidativo provocato da MMP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) subivano un aumento della mortalità per apoptosi accompagnata da una forte diminuzione dell'espressione delle 14-3-3. Quando veniva eseguito un pre-condizionamento a scopo protettivo le PC12 recuperavano la vitalità e questa era associata con una sovra-espressione delle 14-3-3. Anche nel nostro caso le PC12 trattate con cisplatino $13\mu M$ hanno mostrato un repentino aumento dell'espressione di questa proteina con un picco di espressione dopo 1 minuto per poi ridursi bruscamente e rimanere a livelli pari o inferiori a quelli del controllo. Il trattamento con la sola flunarizina invece causava un aumento della proteina istantaneo che poi si abbassava restando comunque a livelli basali. Quando veniva eseguito il co-trattamento la 14-3-3 β veniva espressa ad alti livelli per quasi tutti i tempi di esposizione.

Si può quindi supporre che le PC12 sottoposte all'azione tossica del cisplatino rispondevano aumentando la produzione della 14-3-3 β per sequestrare le molecole pro-apoptotiche e per promuovere l'attivazione di risposte anti-apoptotiche per esempio il legame tra la PKC ζ e Raf-1 (Xing et al., 2000). Il calo successivo potrebbe essere giustificato dal fatto che in seguito la cellula attivava altri meccanismi di protezione, come l'attivazione delle PKC. L'effetto protettivo della flunarizina invece sembrava attuarsi proprio mantenendo elevati i livelli di espressione della 14-3-3 β come se con questo meccanismo non facesse altro che prolungare la protezione che era naturalmente operata nelle fasi iniziali dalle PC12. La sovra-espressione della proteina 14-3-3 è stata anche spesso associata ad una in attivazione delle PKC (Meller et al., 1996; Hausser et al., 1999). Questo spiegherebbe perché il pre-trattamento con la flunarizina causava un abbassamento del livello di espressione di tutte le proteichinasi da noi analizzate.

Infine, abbiamo indagato l'espressione del GAPDH, questa proteina viene considerata un molecola targhet, in grado di funzionare da sensore dello stress ossidativo (Chuang et al., 2005) e sembra essere legata al processo apoptotico (Dastoor & Dreyer, 2001).

Chen et al. (1999) hanno documentato un aumento dell'espressione del GAPDH in cellule nervose trattate con AraC, questa crescita era evidente dalle 8h fino a 24h di trattamento per poi calare lievemente. La sovra-espressione della proteina è stata strettamente correlata al processo apoptotico, Dastoor & Dreyer (2001) hanno osservato che nelle cellule in apoptosi il livello del GAPDH era tre volte maggiore di quello delle cellule non apoptotiche.

Le PC12 da noi analizzate mostravano un aumento dell'espressione del GAPDH a partire da 3h di trattamento con cisplatino fino a 48h. Inoltre, la sua localizzazione da citoplasmatica nel campione non trattato diventava in alcune cellule nucleare già dopo 3h di trattamento con il chemioterapico. La traslocazione della proteina nel nucleo è stata considerata come un evento chiave durante l'apoptosi, come uno dei primi eventi che si attivano prima di raggiungere il punto di non ritorno (Dastoor & Dreyer, 2001).

Il livello di espressione del GAPDH cresceva anche durante lo stress ossidativo (Dastoor & Dreyer, 2001). L'aumento di espressione della proteina osservato nelle PC12 potrebbe essere correlato con l'induzione della formazione di ROS da parte del cisplatino. La flunarizina non causava nessuna variazione del livello basale del GAPDH. Durante il co-trattamento, invece, induceva una riduzione dell'espressione della proteina in esame. Questo portrebbe indicare che la flunarizina oltre ad agire da bloccante del calcio è in grado di fungere da antiossidante come già affermato da So et al. (2005, 2006, 2008).

5 CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI

Il cisplatino (cis-DDP) è risultato estremamente tossico su tutte le linee cellulari oggetto di questo studio (OC-k3 e PC12 indifferenziate e differenziate). La sua azione dose e tempo dipendente si realizzava provocando danni al citoscheletro e inducendo la morte cellulare per apoptosi o probabilmente per necrosi a concentrazioni molto alte.

Dagli studi di protezione eseguiti sulle OC-k3 il ginkgoselect (un estratto del *Ginkgo biloba*) si è dimostrato un composto con buone capacità protettive, permettendo un recupero della vitalità nelle cellule trattate con cis-DDP 13 μ M e una riduzione del processo apoptotico. La protezione era dose e tempo dipendente. L'effetto protettivo maggiore si osservava dopo 48h alla concentrazione di ginkgoselect 150 μ g/ml e dopo un pre-trattamento di 24h. I dati raccolti sono risultati incoraggianti e utili per poter continuare gli studi di protezione, che saranno rivolti anche su colture primarie dell'organo del Corti. Di particolare interesse sarà valutare anche il meccanismo d'azione del protettore, sia analizzando i livelli di ossidazione cellulare con il test per il GSH, sia documentando l'espressione di proteine coinvolte nel pathway apoptotico. Questi lavori ci serviranno per stabilire se il ginkgoselect nei confronti del cisplatino agisce come un antiossidante, se interferisce con il chemioterapico sequestrandolo dal mezzo di coltura o riducendo la sua capacità di penetrare entro la cellula e quindi di esplicitare la sua azione tossica.

Per quanto riguarda il secondo protettore, la flunarizina, i test sulle PC12 indifferenziate e differenziate hanno evidenziato che anch'esso attuava una buona protezione nei confronti dell'azione tossica del cis-DDP, sia aumentando la vitalità cellulare sia riducendo l'apoptosi. La dose efficace per proteggere le cellule indifferenziate è risultata la 10 μ M mentre per i neuroni era la 1 μ M. Interessante è stato osservare che per le PC12

indifferenziate la protezione nei confronti del cisplatino 13 μ M era totale, mentre per la dose 50 μ M si osservava un buon recupero ma non completo. Nei confronti dei neuroni la protezione massima si aveva rispetto al cisplatino 13 μ M ma la flunarizina a parte dare un recupero della vitalità non era in grado di prevenire il danno al citoscheletro che risultava nella perdita dei neuriti.

Gli studi eseguiti in merito al meccanismo d'azione sia del cisplatino sia della flunarizina ci hanno permesso di porre le basi per continuare la ricerca in modo sempre più mirato. Possiamo pensare che probabilmente alla dose di cis-DDP utilizzata per i co-trattamenti (13 μ M) le cellule si trovavano in una fase precoce dell'apoptosi considerata reversibile. Questo potrebbe spiegare perché la mortalità non risultava mai nell'intorno del 50% e la mancata espressione di proteine del pathway apoptotico come MAPK che normalmente mediano in modo più tardivo i segnali apoptotici di entrambe le vie. Infatti, abbiamo documentato l'espressione di proteine che sono molto a monte rispetto all'attivazione degli effettori di morte, quindi possiamo dire di avere studiato il meccanismo più precoce di risposta cellulare all'insulto.

In questa condizione la cellula attivava inizialmente una via anti-apoptotica coinvolgendo le 14-3-3 β e le PKC e in seguito cominciava ad esprimere proteine pro-apoptotiche con la PKC δ . Inoltre, l'aumento di espressione del GAPDH e la sua traslocazione nel nucleo, seppur ristretta ad un numero limitato di cellule, indicava che le PC12 si trovavano in una fase "decisionale". Solo un ulteriore input tossico, che poteva essere una dose superiore del chemioterapico o un tempo di esposizione maggiore, avrebbero potuto causare la irreversibilità del processo apoptotico. Pertanto in futuro sarebbe interessante documentare la risposta apoptotica delle PC12 a dosi più elevate di cis-DDP.

Il meccanismo di protezione della flunarizina sembrava quello di ritardare l'effetto apoptotico del cisplatino, infatti, i danni causati dal cis-

DDP 50 μ M venivano ridotti ma restavano a livelli paragonabili a quelli dovuti al cisplatino 13 μ M. Inoltre, sembrava agire stimolando la risposta anti-apoptotica cellulare aumentando l'espressione della 14-3-3 β e riducendo quella del GAPDH. Interessante sar  documentare il pathway di espressione dell'apoptosi su PC12 co-trattate con flunarizina 10 μ M e cisplatino 50 μ M al fine di documentare come possa agire questo protettore nei confronti di un danno che probabilmente pone le cellule in una condizione di irreversibilit  del processo.

Sar  altres  importante verificare, con l'uso dell'equorinometro, come sia la flunarizina sia il cisplatino agiscono sulla concentrazione del calcio citoplasmatico e se tali ed eventuali variazioni determinano le modifiche nell'espressione delle proteine oggetto di questo studio, in particolare delle PKC. Allo stesso tempo verranno eseguite delle indagini per documentare se la flunarizina   in grado di bloccare lo stress ossidativo stimolato dal cis-DDP. Queste prove ci permetteranno di chiarire se nella suo meccanismo protettivo la flunarizina agisca come bloccante del calcio o come antiossidante.

Infine, si continueranno le ricerche in merito allo studio della protezione neuronale, svolgendo le medesime prove eseguite sulle PC12 indifferenziate anche su quelle differenziate per poi esportare le conoscenze acquisite su colture primarie di neuroni del ganglio spirale.

6 BIBLIOGRAFIA

- Aikawa R., Komuro I., Yamazaki T., Zou Y., Kudoh S., Tanaka M., Shojima I. Hiroi Y. & Yazaki Y. (1997).** Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J. Clin. Invest.*, 100: 1813-1821.
- Aitken A., Howell S., Jones D., Madrazo J., Martin H., Patel Y. & Robinson K. (1995).** Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol. Cell Biochem.*, 149/150: 41-49.
- Alam S. A., Ikeda K., Oshima T., Suzuki M., Kawase T., Kikuchi T. & Takasaka T. (2000).** Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear. Res.*, 141: 28-38.
- Alberts D. S. & Noel J. K. (1995).** Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anticancer Drugs*, 6: 369-383.
- Allen R. T., Cluck M. W. & Agrawal D. K. (1998).** Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol. Life. Sci.*, 54: 427-445.
- Amràn D., Sancho P., Fernández C., Esteban D., Ramos A. M., Blas E., Gómez M., Palacios M. A. & Aller P. (2005).** Pharmacological inhibitor of extracellular signal-regulated protein kinase attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukaemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation. *Bioch. Biophys. Acta*, 1743: 269-279.
- Anderson C. N. G. & Tolkovsky A. M. (1999).** A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: Protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside. *J. Neurosci.*, 19: 664-673.
- Andrews P. A. & Howell S. B. (1990).** Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*, 2: 35-43.
- Antonsson B., Montessunit S., Lauper S., Eskes R. & Martinou J. C. (2000).** Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.*, 345 (Pt2): 271-278.
- Apfe S. C., Arezzo J. C., Lipson L. & Kessler J. A. (1992).** Nerve growth factor prevents experimental cisplatin neuropathy. *Ann. Neurol*, 31: 76-80.
- Aplin A. E., Hogan B. P., Tomeu J. & Juliano R. L. (2002).** Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. *J. Cell Sci.*, 115: 2781-2790.
- Askenazi A. (2002).** Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*, 2 (6): 420-430.
- Ashmarina L. I., Louzenko S. E., Severin S. E., Muronetz V. I. & Nagradova N. K. (1988).** Phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.*, 231: 413-416.
- Astolfi L., Simoni E., Ciorba A. & Martini A. (2008).** *In Vitro* protective effects of *Ginkgo biloba* against cisplatin toxicity in mouse cell line OC-k3. *Audiol. Med.*, 6 (4): 251-258.
- Autieri M. V. & Carbone C. J. (1999).** 14-3-3Gamma interacts with and is phosphorylated by multiple protein kinase C isoforms in PDGF-stimulated human vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol.*, 18: 555-564.
- Banfi B., Malgrange B., Knisz J., Steger K., Dubois-Dauphin M., & Crause K. H. (2004).** Nox3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.*, 277: 39739-39748.
- Bastianetto S., Ramassamy C., Dore S., Christen Y., Poirier J. & Quirion R. (2000a).** The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by amyloid. *Eur. J. Neurosci.*, 12: 1882-1890.
- Bastianetto S., Zheng W. H. & Quirion R. (2000b).** The *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J. Neurochem.*, 74: 2268-2277.
- Basu A. & Akkaraju G. R. (1999).** Regulation of caspase activation and cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced cell death by protein kinase C. *Biochemistry*, 38, 4245-4251.
- Basu A., Woolard M. D. & Johnson C. L. (2001).** Involvement of protein kinase C- σ in

DNA damage-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 8: 899-908.

Batistatou A. & Greene L. A. (1991). Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J. Cell Biol.*, 5: 461-471.

Berg D., Holzmann C. & Riess O. (2003). 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 752-762.

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronili V. & Di Lisa F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 264 (3): 687-701.

Berry M. D. & Boulton A. A. (2000). Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. *J. Neurosci. Res.*, 60: 150-154.

Bertolaso L., Martini A., Bindini D., Lanzoni I., Parmeggiani A., Vitale C., Kalinec G., Kalinec F., Capitani S. & Previati M. (2001). Apoptosis in the OC-k3 immortalized cell line treated with different agents. *Audiology*, 40: 327-335.

Bertolaso L., Bindini D., Previati M., Falcione D., Lanzoni I., Parmeggiani A., Vitali C., Corbacella E., Capitani S. & Martini A. (2003). Gentamicin-induced cytotoxicity involves protein kinase C activation glutathione extrusion and malondialdehyde production in an immortalized cell line from the organ of Corti. *Audiol. Neurootol.*, 8: 38-48.

Biales B., Dichter M. & Tischler A. (1976). Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J. Physiol.*, 262: 743-753.

Blanchet C., Erostegeui C., Sugasawa M. & Dulon D. (1996). Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig uoter hair cells: its dependance on a calcium influx through nicotinic-like receptor. *J. Neurosci.*, 16: 2574-2584.

Blass M., Kronfeld I., Kazimirsky G., Blumberg P. M. & Brodie C. (2002). Tyrosine phosphorylation of protein kinase C δ is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 182-195.

Böhm, I. & Schild H. (2003). Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imag. Biol.*, 5 (1): 2-14.

Bokemeyer C., Berger C. C., Hartmann J. T. Kollmannsberger C., Schmoll H. J., Kuczyk M. A. & Kanz L. (1998). Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br. J. Cancer*, 77: 1355-1362.

Borle A B. (1981). Control, modulation, and regulation of cell calcium. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 90: 13-153.

Bouillet P. & Strasser A. (2002). BH3-only proteins- evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.*, 115 (Pt 8): 1567-1574.

Bowers W. J., Chen X., Guo H., Frisina D. R., Federoff H. J. & Frisina R. D. (2002). Neurotrophin-3 transduction attenuates cisplatin spiral ganglion neuron ototoxicity in the cochlea. *Mol. Ther.*, 6: 12-8.

Boyce M. & Yuan J. (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life death. *Cell Death Differ.*, 13: 363-373.

Breckenridge D. G. & Xue D. (2004). Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16 (6): 647-52.

Brenner B., Koppenhoefer U., Weinstock C., Linderkamp O., Lang F. & Gulbins E. (1997). Fas- or Ceramide-induced Apoptosis Is Mediated by a Rac1-regulated Activation of Jun N-terminal Kinase/p38 Kinases and GADD153. *J. Biol. Chem.*, 272 (35): 22173-22181.

Brodie C. & Blumberg P. M. (2003). Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ . *Apoptosis*, 8: 19-27.

Brücke T., Wober C., Podreka I., Wober-Bingol C., Asenbaum S., Aull S., Wenger S., Ilieva D., Harasko-van der Meer C. & Wessely P. (1995). D2 receptor blockade by flunarizine and cinnarizine explains extrapyramidal side effects. A SPECT study. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, 15: 513-518.

Brune B. & Lapetina E. G. (1996). Nitric oxide-induced covalent modification of glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Methods Enzymol.*, 269: 400-407.

Buckley S., Driscoll B., Barsky L., Weinberg K., Anderson K. & Warburton D. (1999). ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am. J. Physiol.*, 277: 159-166.

Campbell N. A. (2004). *Biologia*. Zanichelli Editore: pp.1465.

Campbell K. C., Meech R. P., Rybak L. P. & Hughes L. F. (2003). The effect of D-methionine on cochlear oxidative state with and without cisplatin administration: mechanisms of otoprotection. *J. Am. Acad. Audiol.*, 14: 144-156.

- Cardinaal R. M., de Groot J. C., Huizing E. H., Veldman J. E. & Smoorenburg G. F. (2000).** Histological effects of co-administration of an ACTH((4-9)) analogue, ORG 2766, on cisplatin ototoxicity in the albino guinea pig. *Hear. Res.*, 144: 157-167.
- Cardone M. H., Salvesen G. S., Widmann C., Johnson G. & Frisch S. M. (1997).** The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*, 90: 315-323.
- Celis J. E., Gesser B., Rasmussen H. H., Madsen P., Leffers H., Dejgaard K., Honore B., Olsen E., Ratz G. & Lauridsen J. B. (1990).** Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells: the transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data. *Electrophoresis*, 11(12): 989-1071.
- Cerella C., Mearrelli C., Coppola S., D'Alessio M., De Nicola M., Diederich M. & Ghibelli L. (2007).** Sequential phases of Ca²⁺ alterations in pre-apoptotic cells. *Apoptosis*, 12: 2207-2219.
- Chan T. A., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (1999).** 14-3-3 Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401: 616-620.
- Chandel N. S., Vander Heiden M. G., Thompson C. B. & Schumaker P. T. (2000).** Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene*, 19: 3840-3848.
- Chao D. T. & Korsmeyer S. J. (1998).** Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 395-419.
- Charruyer A., Jean C., Colomba A., Jaffrezou J. P., Quillet-Mary A., Laurent G. & Bezombes C. (2007).** PKC ζ protects against UV-C-induced apoptosis by inhibiting acid sphingomyelinase-dependent ceramide production. *Biochem. J.*, 405: 77-83.
- Chauhan D., Li G., Hideshima T., Podar K., Mitsiades C., Mitsiades N., Munshi N., Kharbanda S. & Anderson K. C. (2003).** JNK-dependent Release of Mitochondrial Protein, Smac, during Apoptosis in Multiple Myeloma (MM) Cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 17593-17596.
- Chen Y. R. & Tan T. H. (2000).** The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling. *Int. J. Oncol.*, 16: 651-662.
- Chen R. W., Saunders P. A., Wie H., Li Z., Seth P. & Chuang D. M. (1999).** Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *J. Neurosci.*, 19 (21): 9654-9662.
- Chen M., He H., Zhan S., Krajewski S., Reed J. C. & Gottlieb R. A. (2001).** Bid is cleaved by calpain to an active fragment *in vitro* and during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.*, 276: 30724-30728.
- Chen J. W., Chen Y. H., Lin F. Y., Chen Y. L. & Lin S. J. (2003).** *Ginkgo biloba* extract inhibits tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 7: 1559-1566.
- Chen X. W., Sun S. G., Cheng D. B. & Tian Y. Y. (2006).** Overexpression of 14-3-3 protein protects pheochromocytoma cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity. *Neurosci. Bull.*, 22: 281-287.
- Cheng E., Kirsch D. G., Clem R. J., Ravi R., Kastan M. B., Bedi A., Ueno K. & Hardwick J. M. (1997).** Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 278: 1966-1968.
- Choi D. W. (1988).** Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends. Neurosci.*, 11: 465-469.
- Choi B. K., Choi C. H., Oh H. L. & Kim Y. K. (2004).** Role of ERK activation in Cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma cell. *Neurotoxicology*, 25: 915-924.
- Chouza C., Scaramelli A., Caamano J. L., De Medina O., Aljanati R. & Romero S. (1986).** Parkinsonism, tardive dyskinesia, akathisia, and depression induced by flunarizine. *Lancet*, 1: 1303-1304.
- Chuang D. M., Hough C. & Senatorov V. (2005).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 269-290.
- Cířpák L., Rauko P., Miadoková E., Cířpáková I. & Novotný L. (2003).** Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leukem. Res.*, 27: 65-72
- Clerici W. J., Di Martino D. L. & Prasad M. R. (1995).** Direct effect of reactive oxygen species on cochlear outer hair cells. *Hear. Res.*, 84: 30-40.
- Clerici W. J., Hensley K., Di Martino D. L. & Butterfield D. A. (1996).** Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res.*, 98: 116-124.

- Cory S. & Adams J. M. (2002).** The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2 (9): 647-656.
- Coupland R. E. (1965a).** Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. i. the ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla *J. Anat.*, 99: 230-254.
- Coupland R. E. (1965b).** *The Natural History of the Chromaffin*. Longmans, Green & Co. Ltd, London, pp: 47-76.
- Cross T. G., Scheel-Toellner D., Henriquez N. V., Deacon E., Salmon M. & Lord J. M. (2000).** Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 256: 34-41.
- Cui W., Yaziovitskaya E. W., Mayo M. S., Pelling J. C. & Person D. L. (2000).** Cisplatin-induced response of c-Jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal-regulates protein kinase 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines. *Mol. Carciog.*, 29: 219-228.
- Curtin J. F., Donovan M. & Cotter T. G. (2002).** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods*, 265: 49-72.
- Darlington C. L., Smith P. F. & Macleannan K. (1997).** Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb-761) on recovery from peripheral vestibular deafferentation (vestibular compensation). In: Papadopoulos, V., Drieu, K., Christen, Y. (Eds.), *Advances in Ginkgo biloba Research, Vol. 6. Adaptive Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb-761)*. Elsevier, Paris, pp. 47-58.
- Dastoor Z. & Dreyer J. L. (2001).** Potential role of nuclear translocation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J. Cell Sci.*, 114 (9): 1643-1653.
- Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. & Greenberg M. E. (1997).** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91: 231-241.
- Davies K. J. A. (2000).** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279-289.
- Davis R. J. (2000).** Signal transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, 103: 239-252.
- De Feudis F. V. & Drieu K. (2000).** *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr. Drug Targets.*, 1: 25-58.
- Deacon E. M., Pongracz J., Griffiths G. & Lord J. M. (1997).** PKC isoenzymes: Differential involvement in apoptosis and pathogenesis. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 50: 124-131.
- Dehne N., Lautermann J., Petrat F., Rauen U. & de Groot H. (2001).** Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 174: 27-34.
- Dempsey E. C., Newton A. C., Mochly-Rosen D., Fields A. P., Reyland M. E., Insel P. A. & Messing R. O. (2000).** Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 279: L429-L438.
- Devarajan P., Savoca M., Castaneda M. P., Park M. S., Esteban-Cruciani N., Kalinec G. & Kalinec F. (2002).** Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear. Res.*, 174: 45-54.
- DeWoskin R. S. & Riviere J. E. (1992).** Cisplatin-induced loss of kidney copper and nephrotoxicity is ameliorated by a single dose of diethylthiocarbamate but not mesna. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112: 182-189.
- Diamond B. J., Shiflett S. C., Feiwei N., Matheis R. J., Noskin O., Richards J. A., Schoenberger N. E. (2000).** *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 81: 668-678.
- Dispersyn G., Nuydens R., Borgers M. & Geerts H. (1999).** Nimodipine and flunarizina have different effects on survival and morphology of PC12 cells during nerve growth factor deprivation. *Eur. J. Pharmacol.*, 384: 61-70.
- Dive C. & Hichman J. A. (1991).** Drugs-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br. J. Cancer*, 64:192-196.
- Dobyan D. C., Levi J., Jacobs C. Kosek J. & Weiner M. W. (1980).** Mechanism of cisplatin nephrotoxicity: II. Morphology observations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 213: 551-556.
- Donovan N., Becker E. B., Konishi Y. & Bonni A. (2002).** JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J. Biol. Chem.*, 277: 40944-40949.
- Dooley N. P., Baltuch G. H., Groome N., Villemure J. G. & Yong V. W. (1998).** Apoptosis is induced in glioma cells by antisense oligonucleotides to protein kinase Ca

and is enhanced by cycloheximide. *Neuroreport*, 9: 1727-1733.

Dowd D. R. (1995). Calcium regulation of apoptosis. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, 30: 255-280.

Drieu K. (1986). Preparation and definition of *Ginkgo biloba* extract. *Presse Med.*, 15: 1455-1457.

Dulon D., Zajic G. & Schacht J. (1991). Differential motil response of isolate inner and outer hair cells to stimulation by potassium and calcium ions. *Hear. Res.* 52: 225-231.

Dulon D., Luo L., Zhang C. & Ryan A. F. (1998). Expression of small conductance calcium-activated potassium channel (SK) in outer hair cells of the rat cochlea. *Eur. J. Neurosci.*, 10: 907-915.

Dispersyn G., Nuydens R., Borgers M. & Geerts H. (1999). Nimodipine and flunarizine have different effects on survival and morphology of PC12 cells during nerve growth factor deprivation. *Eur. J. Pharmacol.*, 384: 61-70.

Eastman A. (1991). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Cancer Treat. Res.*, 57: 233-49.

Eguchi Y., Shimizu S. & Tsujimoto Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, 57: 1835-1840.

Eichler M. E., Dubinsky J. M., Tong J. & Rich K. M. (1994). The ability of diphenylpiperazines to prevent neuronal death in dorsal root ganglion neurons in vitro after nerve growth factor deprivation and *in vivo* after axotomy. *J. Neurochem.*, 62: 2148-2157.

Ekborn A. (2003). *Cisplatin induced ototoxicity. Pharmacokinetics, prediction and prevention.* (Tesi) pp. 44. Department of Otorhinolaryngology and Head & Neck Surgery, Karolinska Hospital and the Department of clinical Neuroscience, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Ekborn A., Laurell G., JohnstroM. P., Wallin I., Eksborg S. & Ehrsson H. (2002). D-Methionine and cisplatin ototoxicity in the guinea pig: D-methionine influences cisplatin pharmacokinetics. *Hear. Res.*, 165: 53-61.

Ekborn A., Laurell G., Ehrsson H. & Miller J. (2003). Intracochlear administration of thiourea protects against cisplatin-induced outer hair cell loss in the guinea pig. *Hear. Res.*, 181: 109-15.

Elimadi A., Bouillot L., Sapena R., Tillement J. P. & Morin D. (1998). Dose-related inversion of cinnarizine and flunarizine

effects on mitochondrial permeability transition. *Eur. J. Pharmac.*, 348: 115-121.

Ellis H. M. & Horvitz H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817-829.

Ellis R. E.; Yuan J. Y. & Horvitz H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7: 663-698.

Eminel S., Klettner A., Roemer L., Herdegen T. & Waetzig V. (2004). JNK2 translocation to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J. Biol. Chem.*, 279 (53): 55385-55392.

Enari M., Sakahira H, Yokoyama H. Okawa K. Iwamatsu A. & Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662): 43-50.

Erhardt P., Schremser E. J. & Cooper G. M. (1999). B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol. Cell Biol.*, 19: 308-315.

Evans, R. M. & Simpkins H. (1998). Cisplatin induced intermediate filament reorganization and altered mitochondrial function in 3T3 cells and drug-sensitive and -resistant Walker. *Exp. Cell Res.*, 245: 69-78.

Evans P. & Halliwell B. (1999). Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann. NY Acad. Sci.*, 884: 19-40.

Fadeel B., Zhivotovsky B. & Orrenius S. (1999). All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB. J.*, 13 (13): 1647-57.

Fan M. & Chambers T. C. (2001). Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist. Updat.*, 4: 253-267.

Fessenden J. D. & Schact J. (1998). The nitric oxide/cyclic GMP pathway: a potential major regulator of cochlear physiology. *Hear. Res.*, 118: 168-76.

Feghali J. G., Liu W. & Van de Water T. R. (2001). L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope*, 111: 1147-1155.

Feuerstein G. Z. & Young P. R. (2000). Apoptosis in cardiac diseases: stress-and mitogen activated signaling pathway. *Cardiovasc. Res.*, 45: 560-569.

Finley R. S., Fortner C. L. & Grove W. R. (1985). Cisplatin nephrotoxicity: a summary

- of preventive interventions. *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 19: 362-367.
- Forge A (1985).** Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear. Res.*, 19: 171-182.
- Frasch S. C., Henson P. M., Kailey J. M., Richter D. A., Janes M. S., Fadok V. A. & Bratton D. L. (2000).** Regulation of phospholipids scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase C δ . *J. Biol. Chem.*, 275: 23065-23073.
- Frutos S., Moscat J. & DiazMeco M. T. (1999).** Cleavage of zPKC but not l/i PKC by caspase 3 during UV-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274: 10765-10770.
- Fu H., Subramanian R. R. & Marsters S. C. (2000).** 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40: 617-647.
- Fuchs S. Y., Adler V., Buschmann T., Yin Z., Wu X., Jones S. N. & Roni Z. (1998).** JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.*, 12: 2658-2663.
- Fujita N.; Nagahashi A., Nagashima K., Rokudai S. & Tsuruo T. (1998).** Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene*, 17: 1295-1304.
- Fukaya H. & Yasuta H. (1998).** The effect of extract from Ginkgo biloba (EGb 761) on cisplatin induced ototoxicity. (*Poster*).
- Fulda S., Sieverts H., Friesen C., Herr I. & Debatin K. M. (1997).** The CD95 (APO-1/Fas) System Mediates Drug-induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *Cancer Res.*, 57: 3823-3829.
- Fumarola C. & Guidotti G. G. (2004).** Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*, 9 (1): 77-82.
- Garber S. S., Hoshi T. & Aldrich R. W. (1989).** Regulation of ionic currents in pheochromocytoma cells by nerve growth factor and dexamethasone. *J. Neurosci.*, 9: 3976-3987.
- Gately D. P. & Howell S. B. (1993).** Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer*, 67: 1171-1176.
- Gewis A. (2003).** Introduction to apoptosis. *ApoReview*, pp. 26.
- Ghibelli L., Cerella C., Cordisco S., Clavarino G., Marazzi S., Nicola M., Nuccitelli S., D'Alessio M., Magrini A., Bergamaschi A., Guerrisi V. & Porfiri L. (2006).** NMR exposure sensitizes tumor cells to apoptosis. *Apoptosis*, 11: 359-365.
- Ghosh A. & Greenberg M. E. (1995).** Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 268: 239-47.
- Gill J. S. & Windebank A. J. (1998).** Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *J. Clin. Invest.*, 101 (12): 2842-2850.
- Gil-Parrado S., Fernandez-Montalvan A., Assfalg-Machleidt I., Popp O., Bestvater F., Holloschi A., Knoch T. A., Auerswald E. A., Welsh K., Reed J. C., Fritz H., Fuentes-Prior P., Spiess E., Salvesen G. S. & Machleidt W. (2002).** Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.*, 277: 27217-27226.
- Gluecksmann A. (1951).** Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, 26: 59-86.
- Goekjian P. G., & Jirousek M. R. (2001).** Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, 10: 2117-2140.
- Goncalves T., Carvalho A. P. & Oliveira C. R. (1991).** Antioxidant effect of calcium antagonists on microsomal membranes isolated from different brain area. *Eur. J. Pharmacol.*, 204: 315-322.
- Goodnight J. A., Mischak H., Kolch W. & Mushinski J. F. (1995).** Immunocytochemical localization of eight protein kinase c isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts: isoform-specific association with microfilaments, golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 270: 9991-10001.
- Goodsell D. S. (2006).** The molecular perspective: Cisplatin. *The Oncologist*, 11: 316-317.
- Gopalakrishna R. & Gundimeda (2002).** Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *U. J. Nutr.*, 132: 3819S.
- Gopalakrishna R. & Jaken S. (2000).** Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 28:1349.
- Goping I. S., Gross A., Lavoie, J. N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S. J. & Shore G. C. (1998).** Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J. Cell Biol.*, 143: 207-215.
- Gorman A. M., Orrenius S., Ceccatelli S. (1998).** Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport*, 9 (10): R49-55.

- Grandori F. & Martini A (1995).** *Potenziali evocati uditivi. Basi teoriche e applicazioni chimiche.* Ed. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova: pp. 635.
- Granville D. J., Carthy C. M., Hunt D. W. & McManus B. M (1998).** Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.*, 78: 893-913
- Greene L. A. & Tischlert A. S. (1976).** Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor (sympathetic neurons/cell culture/catecholamines/differentiation/neurites). *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 73: 2424-2428.
- Greenberg D. A., Carpenter C. L. & Messing R. O. (1987).** Ethanol-induced component of 45Ca^{2+} uptake in PC12 cells is sensitive to Ca^{2+} channel modulation drugs. *Brain Res.*, 410: 143-146.
- Griffiths G., Garrone B., Deacon E. M., Owen P. J., Mead G., Bradwell A., Watters D. & Lord J. M. (1996).** The polyether Bistratene A selectively activates protein kinase C-d in HL60 cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 222: 802-808.
- Gross A., Yin X. M., Wang K., Wei M. C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P. & Korsmeyer S. J. (1999).** Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.*, 274: 1156-1163.
- Guastalla J., Vermorken J. B., Wils J. A., Gorge M., Scotto V., Nooij M., ten Bokkel Huinnink W. W., Dalesio O. & Renard J. (1994).** Phase II trial for intraperitoneal cisplatin plus intravenous sodium thiosulphate in advanced ovarian carcinoma patients with minimal residual disease after cisplatin-based chemotherapy-a phase II study of the EORTC Gynaecological Cancer Cooperative Group. *Eur. J. Cancer*, 30A: 45-49.
- Guenzi S. (2006).** Kit e prodotti per lo studi dell'apoptosi. *Biotechnologie 2000*: 8-15.
- Guidetti C., Paracchini S., Lucchini S., Cambieri M. & Marzatico F. (2001).** Prevention of neuronal cell damage induced by oxidative stress *in-vitro*: effect of different *Ginkgo biloba* extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53: 387-392.
- Gupta S. (2001).** Molecular Steps of death receptor and mitochondrial pathway of apoptosis. *Life Science*, 69: 2957-2964.
- Gutcher I., Webb P. R. & Anderson N. G (2003).** The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Molec. Life Sci.*, 60: 1061-1070.
- Gutteridge J. M. & Halliwell B.(2000).** Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899:136-147.
- Guyton K. Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q. & Holbrook N. J. (1996).** Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2 . role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.*, 271: 4138-4142.
- Hagemann C. & Blank J. L. (2001).** The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cellular Signalling*, 13: 863-875.
- Haimovitz-Friedman A., Balaban N., McLoughlin M., Ehleiter D., Michaeli J., Vlodavsky I. & Fuks Z. (1994).** Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 54: 2591-2597.
- Haldar S., Jena N. & Croce C. M. (1995).** Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 4507-11.
- Hara M. R., Cascio M. B. & Sawa A. (2006).** GAPDH as a sensor on NO stress. *Bioch. Biophys.*, 1762: 502-509.
- Harada H., Becknell B., Wilm M., Mann M., Huang L. J., Taylor S. S., Scott J. D. & Korsmeyer S. J. (1999).** Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase. *Mol. Cell*, 3: 413-422.
- Hausser A., Storz P., Link G., Stoll H., Liu Y .C., Altman A., Pfizenmaier K. & Johannes F. J. (1999).** Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J. Biol. Chem.*, 274: 9258-64.
- Hayakawa J., Ohmichi M., Kurachi H., Ikegami H., Kimura A., Matsuoka T., Jikihara H., Mercola D & Murata Y. (1999).** Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line. *J. Biol. Chem.*, 274:31648-31654.
- He H., Lam M., McCormick T. S. & Distelhorst C.W. (1997).** Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J. Cell. Biol.*, 138: 1219-1228.
- Hengartner M. O. (2000).** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805): 770-6.
- Henkels K. M. & Turchi J. J. (1997).** Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and

resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 57: 4488-4492.

Henkels K. M. & Turchi J. J. (1999). Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, 59: 3077-3083.

Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T. C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K. W. & Vogelstein B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell*, 1: 3-11.

Hess A., Bloch W., Huverstuhl J., Su J., Stennert E., Addicks K. & Michel, O. (1999). Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOSII) in the cochlea of guinea pigs after intratympanic endotoxin treatment. *Brain Res.*, 830: 113-122.

Higuchi M., Honda T., Proske R. J. & Yeh E. T. H. (1998). Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene*, 17: 2753-2760.

Hilton M. P. & Stuart E. L. (2009). *Ginkgo biloba for tinnitus (Review)*. John Wiley & Sons The Cochrane Collaboration. pp-19.

Hockenbery D. M., Oltvai Z. N., Yin X. M., Millman C. L. & Korsmeyer S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75: 241-251.

Huang H., Zhu L., Reid B. R., Drobny G. P. & Hopkins P. B. (1995). Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand crosslink. *Science*, 270: 1842-1845.

Huang T., Cheng A.G., Stupak H., Liu W., Kim A., Staecker H., Lefevre P. P., Malgrange B., Kopke R., Moonen G. & Van de Water T. R. (2000). Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 18: 259-270.

Huang X., Whitworth C. A. & Rybak L. P. (2007). *Ginkgo biloba* extract (Gb 761) protect against cisplatin induced ototoxicity in rats. *Otol. Neurotol.*, 28 (6): 828-833.

Humes H. D. (1999). Insights into ototoxicity. Analogies to nephrotoxicity. *Ann. NY Acad. Sci.*, 884: 15-18.

Hutchison F. N., Perez E. A., Gandara D. R., Lawrence H. J. & Kaysen G. A. (1988). Renal salts wasting in patients treated with cisplatin. *Ann. Intern. Med.*, 108: 21-25.

Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Takahashi N., Araki K., Kuwano R. & Takahashi Y. (1988). Molecular cloning of

cDNA coding for brain specific 14-3-3 protein, a protein kinase dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 708-88.

Idris I., Gray S. & Donnelly R. (2001). Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*, 44: 659-673.

Inanami O., Takahashi K., Yoshito A. & Kuwabara M. (1999a). H₂O₂-induced activation of SAPK/JNK regulated by phosphatidylinositol 3-kinase in Chinese hamster V79 cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, 1: 113-121.

Inanami O., Otha T., Ito S. & Kuwabara M. (1999b). of intracellular calcium ions is essential for the H₂O₂-induced activation of SAPK/JNK but not for that of p38 and ERK in Chinese hamster V79 cells. *Antioxid. Redox. Signal.*, 1: 501-508.

Ishitani R., Tanaka M., Sunaga K., Katsube N. & Chuang D. M. (1998). Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurones undergoing apoptosis. *Mol. Pharmacol.*, 53: 701-707.

Israels L. G. (1999). Apoptosis. *Stem Cells*, 17: 306-313.

Ito T., Deng X., Carr B. & May W. S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.*, 272: 11671-11673.

Jamieson E. R. & Lippard S. J. (1999). Structure, recognition and processing of cisplatin DNA adducts. *Chem Rev*, 99: 2467-2498.

Jayadev S., Liu B., Bielawska A. E., Lee J. Y., Nazaire F., Pushkareva M. Y., Obeid L. M. & Hannun Y.A. (1995). Role for ceramide in cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.*, 270: 2047-2052.

Jimenez L. A., Zannella C., Fung H., Jassen Y. M. & Vacek P. (1997). Role of extracellular signal regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H₂O₂. *Am. J. Physiol.*, 273: L1029-L1035.

Jones D. H., Ley S. & Aitken A. (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo and heterodimers in vivo and *in vitro*: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett.*, 368: 55-58.

Jordan P. & Carmo-Fonseca M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 1229-1235.

- Jun C. D., Oh C. D., Kwak H. J., Pae H. O., Yoo J. C., Choi B. M. Chun J. S., Park R. K. & Chung H. T. (1999).** Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: Involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J. Immunol.*, 162: 3395–3401.
- Jung H. G., Cho H. J., Chang I. H., Yoon S. O., Jeon Y. J., Chung M. H. & You H. J. (2002).** Rac 1 prevents cisplatin-induced apoptosis through downregulation of p38 activation in NIH3T3. *FEBS Lett.*, 518: 129-134.
- Kalincic F., Kalincic G., Boukhvalova M. & Kachar B. (1999).** Establishment and characterization of conditionally immortalized organ of Corti cell lines. *Cell Biol. Int.*, 23: 175-184.
- Kang X., Chen J., Xu Z., Li H. & Wang B. (2007).** Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on paraquat-induced apoptosis of PC12 cells. *Toxicol. in Vitro*, 21, 1003-1009.
- Kartalou M. & Essigmann J. M. (2001).** Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.*, 478: 23-43.
- Kass G. E. & Orrenius S. (1999).** Calcium signaling and cytotoxicity. *Envir. Heal. Pers.*, 107(S1): 25-35.
- Katzung B. G. (2006).** *Farmacologia generale e clinica*. Ed. Piccin Nuova Libreria, S.p.A., Padova: pp. 1320.
- Kaufmann S. H. & Earnshaw W. C. (2000).** Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.*, 256 (1): 42-49.
- Kerr J. F. R. (1971).** Shrinkage necrosis: a distinct mode of cell death. *J. Path.*, 105: 13-20.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H. & Currie A. R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- Kharbanda S., Ren R., Pandey P., Shafman T. D., Feller S. M., Weichselbaum, R. R. & Kufe, D. W. (1995).** Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature Lond.*, 376: 785-788.
- Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K., Pandey P., Kaneki M., Wang Q., Cheng K., Chen Y. N., Campbell A., Sudha T., Yuan Z. M., Narula J., Weichselbaum R., Nalin C. & Kufe D. (2000).** Translocation of SAPK/JNK to Mitochondria and Interaction with Bcl-xL in Response to DNA. *J. Biol. Chem.*, 275: 322-327.
- Kim R. (2005).** Unknitting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333 (2): 336-43.
- Kim M. S., So H. S., Park J. S., Lee K. M., Moon B. S., Lee H. S., Kim T. Y., Moon S. K. & Park R. (2000).** Hawansodan protects PC12 cells against serum deprivation induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. *General Pharmacol.*, 34: 227-235.
- Kim Y. K., Kim H. J., Kwon C. H., Kim J. H., Woo J. S., Jung J. S. & Kim J. M. (2005).** Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J. Appl. Toxicol.*, 25: 374-382.
- Kilpatrick L. E., Lee J. Y., Haines K. M., Campbell D. E., Sullivan K. E. & Korchak H. M. (2002).** A role for PKC δ and PI 3-kinase in TNF α -mediated antiapoptotic signaling in the human neutrophil. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283: C48–57.
- Klein R., Brown D. & Turnley A. M. (2007).** Phenoxodiol protects against cisplatin induced neurite toxicity in a PC12 cell model. *Neuroscience*, 8: 61.
- Kolber A. R., Goldstein M. N. & Moore B. W. (1974).** Effect of nerve growth factor on the expression of colchicine-binding activity and 14-3-2 protein in an established line of human neuroblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 71: 4203-4207.
- Konings P. N. M., Makkink W. K., Van Delft A. M. L. & Ruigt G. S. F. (1994).** Reversal by NGF of cytostatic drug-induced reduction of neurite outgrowth in rat dorsal root ganglia in vitro. *Brain Res.*, 640: 195–204.
- Kopke R. D., Liu W., Gabaizadeh R., Jacono A., Feghali J., Spray D., Garcia P., Steinman H., Malgrange B., Ruben R. J., Rybak, L. & Van de Water T. (1997).** The use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin induced damage of auditory hair cells. *Am. J. Otol.*, 18: 559-571.
- Krammer P. H. (2000).** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407: 789-795.
- Kryzanski W., Oberdoester J. & Rabin R. A. (2007).** Mechanisms of ethanol enhancement of apoptosis and caspase activation in serum-deprived PC12. *Life Sci.*, 81: 756-764.
- Kuroki M., Nagamachi S., Hohsi H., Flores L.G., Ohnishi T., Jinnouchi S., Futami S. & Watanaba K. (1996).** Cerebral perfusion imaging evaluates pharmacologic treatment of

unilateral moyamoya disease. *J. Nucl. Med.*, 37: 84–86.

Lam M., Dubyak G., Chen L., Nunez G., Miesfeld R. L. & Distelhorst C. W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca²⁺ fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6569-6573.

Laurell G. & Bagger-Sjoberg D. (1991). Degeneration of the organ of Corti following intravenous administration of cisplatin. *Acta Otolaryngol (Stockh.)*, 111: 891-898.

Laurell G. & Jungnelius U. (1990). High-dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. *Laryngoscope*, 100: 724-734.

Lee J. Y., Hannun Y. A. & Obeid L. M. (1996). Ceramide inactivates cellular protein kinase Ca. *J. Biol. Chem.*, 271: 13169–13174.

Lee Y. W., So C., Chi W. H. & Lee S. H. (1998). Underlying mechanism of cisplatin induced apoptosis in PC12 cell. *J. Korean Neurosurg. Soc.*, 27 (11): 1475-1480.

Leist M. & Jaattela M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. rev. Mol. Cell Biol.*, 2 (8): 589-598.

Leist M., Single B., Castoldi A. F., Kuhnle S. & Nicotera P. (1997). Intracellular ATP concentration: a switch deciding between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, 185: 1481-1486.

Lemasters J. J. (1999). Mechanisms of hepatic toxicity V. Necroapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am. J. Physiol.*, 276 (39): G1-G6.

Leverrier S., Vallentin A. & Joubert D. (2002). Positive feedback of protein kinase C proteolytic activation during apoptosis. *Biochem. J.*, 368: 905-913.

Lewis K. (2000). Programmed death in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 503–514.

Li P., Nijhawa D, Budihardjo I, Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. & Wang X. (1997). Cytochrome c and dATPdependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479-489.

Li G., Frenz D. A., Brhmlblatt S., Feghali J. G., Ruben R. J., Berggren D., Arezzo J. & Van De Water T. R. (2001a). Round window membrane delivery of L-methionine provides protection from cisplatin

ototoxicity without compromising chemotherapeutic efficacy. *Neurotoxicology*, 22: 163-176.

Li L. Y., Luo X. & Wang X. (2001b). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412 (6842): 95-99.

Li G., Sha S. H., Zotova E., Arezzo J., Van De Water T. & Schacht J. (2002). Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. *Lab Invest*, 82: 585-96.

Linag C. S., Rounds N. K., Dong E., Stevens S. Y., Shite J. & Quin F. (2000). Alteration by norepinephrine of cardiac sympathetic nerve terminal function and myocardial b-adrenergic receptor sensitivity in the ferret: normalization by antioxidant vitamins. *Circulation*, 102: 96-103.

Lindsten T., Zong W. X. & Thompson C. B. (2005). Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist*, 11 (1): 10-5.

Lipton S. A. & Rosenberg P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.*, 330: 613-622.

Liu W. S. & Heckman C. A. (1998). The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*, 10: 529–542.

Liu Z. G., Baskaran R., Lea-Chou E. T., Wood L. D., Chen Y., Karin M., & Wang J. Y. (1996). Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature*, 384: 273-276.

Liu W., Staecker H., Stupak H., Malgrange B., Lefebvre P. & Van de Water, T. R. (1998). Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *NeuroReport*, 9: 2609-2614.

Liu Y., Xing H., Han X., Shi X., Liang F., Cheng G., Lu Y. & Ma D. (2008). Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.*, 28(2): 197-199.

Lockshin R. A. & Williams C. M. (1965a). Programmed cell death. IV. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.*, 11: 803-809.

Lockshin R. A. & Williams C. M. (1965b). Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.*, 11: 831-844.

- Lockshin R. A. & Zakeri Z. (2001).** Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2: 545-550.
- Loeffler M. & Kroemer G. (2000).** The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell. Res.*, 256 (1): 19-26.
- Lord J. M. & Pongracz J. (1995).** Protein kinase C: A family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 48: M57-M64.
- Lu Z., Hornia A., Jiang Y. W., Zang Q., Ohno S. & Foster D. A. (1997).** Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 3418-3428.
- Lu Y & Cederbaum A. (2007).** The mode of cisplatin-induced cell death in CYP2E1-overexpressing HepG2 cells: Modulation by ERK, ROS, glutathione, and thioredoxin. *Free Radical Biol. Med.*, 43: 1061-1075.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. & Wang X. (1998).** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490.
- Mackay K. & Mochly-Rosen D. J. (2001).** Localization, Anchoring, and Functions of Protein Kinase C Isozymes in the Heart. *Mol. Cell. Cardiol.*, 33: 1301.
- Maclennan K. M., Darlington C. L. & Smith P. F. (2002).** The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog. Neurobiol.*, 67: 235-257.
- Majewski M., Nieborowska-Skorska M., Salomoni P., Slupianek A., Reiss K., Trotta R., Calabretta B. & Skorski T. (1999).** Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the anti-apoptotic effects of Akt. *Cancer Res.*, 59: 2815-2819.
- Majno G. & Joris, I. (1995).** Apoptosis, oncosis, and necrosis. *Amer. J. Pathol.*, 146: 3-15, 1995.
- Mandal M., Olson D. J., Sharma T., Vadlamudi R. K. & Kumar R. (2001).** Butyric acid induces apoptosis by up-regulating bax expression via Stimulation of the c-Jun N-Terminal Kinase/Activation Protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology*, 120: 71-78.
- Mandic A. (2003).** Elucidation of pro-apoptotic signalling induced by cisplatin. *Tesi*. pp.46. Department of Oncology-Pathology, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
- Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L., Heiden T., Hansson J., Linder S. & Shoshan M. C. (2002).** Calpain mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 22: 3003-3013.
- Mansouri A., Ridgway L. D., Korapati A. L., Zhang Q., Tiant L., Wang Y., Siddik Z. H., Mills G. B. & Claret F. X. (2003).** Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 278 (21): 19245-19256.
- Marcu L., van Doorn T. & Olver I. (2003).** Cisplatin and radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer- a review of their cooperation. *Acta Oncol.*, 42: 315-325.
- Marin M. C., Fernandez A., Bick R. J., Brisbay S., Buja L. M., Snuggs M., McConkey D. J., von Eschenbach A. C., Keating M. J. & McDonnell T. J. (1996).** Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. *Oncogene*, 12: 2259-2266.
- Marks N. & Berg M. J. (1999).** Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, 35 (3): 195-220.
- Marshall C. J. (1995).** Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80:179-185.
- Martelli A. M., Sang N., Borgatti P., Capitani S. & Neri L. M. (1999).** Multiple biological responses activated by nuclear protein kinase C. *J. Cell Biochem.*, 74: 499.
- Martin S. S. & Vuori K. (2004).** Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1692 (2-3): 145-57.
- Martin H., Patel Y., Jones D., Howell S., Robinson K. & Aitken A. (1993).** Antibodies against the major brain isoforms of 14-3-3 protein: an antibody specific for the N-acetylated amino-terminus of a protein. *FEBS Lett.*, 331: 296-303.
- Masters S. C. & Fu H. (2001).** 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (48): 45193-45200.
- Massieu L., Moran J. & Christen Y. (2004).** Effect of *Ginkgo biloba* (Egb 761) on staurosporine-induced neuronal death and

- caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Research*, 1002 (1–2): 76-85.
- McConkey D. J., Nicotera P., Hartzell P., Bellomo G., Wyllie A. H. & Orrenius S. (1989).** Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 269: 365-370.
- McConkey D.J. & Orrenius S. (1995).** Calcium and cyclosporin A in the regulation of apoptosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 200: 95–105.
- McDonald E. S., Randon K. R., Knight A. & Windebank A. J. (2005).** Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.*, 18: 305-313.
- McKay M. M & Morrison D. K. (2007).** Integrating signals from RTKs to ERK/ MAPK. *Oncogene*, 26: 3113-3121.
- McMorris F. A., Nelson P. G. & Ruddle F. H. (1973).** Contributions of clonal systems to neurobiology. *Neurosciences Research Program Bulletin*, 11: 412-536.
- Meeche R. P., Campbell K. C., Hughes L. P. & Ribak L. P. (1998).** A semiquantitative analysis of the effects of cisplatin on the rat stria vascularis. *Hear. Res.*, 124: 44-59.
- Meldrum B. & Garthwaite J. (1990).** Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 11: 379-387.
- Meller N., Liu Y. C., Collins T. L., Bonnefoy-Berard N., Baier G., Isakov N. & Altman A. (1996).** Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function. *Mol. Cell Biol.*, 16: 5782-5791.
- Mellor H. & Parker P. J. (1998).** The extended protein kinase C superfamily. *Bochemical J.*, 281-292.
- Mesner P. W., Winters T. R. & Green S. H. (1992).** Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.*, 119: 1669–1680.
- Minn A. J., Velez P., Schendel S. L., Liang H., Muchmore S. W., Fesik S. W., Fill M. & Thompson C. B. (1997).** Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385:353357.
- Mizukami Y., Yoshioka K., Morimoto S. & Yoshida K. (1997).** A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J. Biochem. Chem.*, 272: 16657-16662.
- Mund T., Gewies A., Schoenfeld N., Bauer M. K. & Grimm S. (2003).** Spike a novel BH3-only protein, regulate apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.*; 17 (6): 696-698.
- Murai K., Tyler R. S., Harker L. A. & Stouffer J. L. (1992).** Review of pharmacologic treatment of tinnitus. *Am. J. Otol.*, 13: 454-464.
- Murphy L. O. & Blenis J. (2006).** MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.*, 31 (5): 268-275.
- Muslin A. J., Tanner J. W., Allen P. M. & Shaw A. S. (1996).** Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell*, 84: 889-897.
- Nagata S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.
- Nakagawa T., Yamane H., Takayama M., Sunami K. & Nakai Y. (1999).** Involvement of nitric oxide in aminoglycoside vestibulotoxicity in *Guinea pigs*. *Neurosci. Lett.*, 267: 57–60.
- Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B. A. & Yuan J. (2000).** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403 (6765): 98-103.
- Nalefski E. A. & Newton A. C. (2001)** Membrane binding kinetics of protein kinase C β II mediated by the C2 domain. *Biochemistry*, 40: 13216-13229.
- Neri L. M., Martelli A. M., Borgatti P., Colamussi M. L., Marchisio M. & Capitani S. (1999).** Increase in nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate synthesis precede PKC-zeta translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J.*, 13: 2299.
- Newton A. C. (1995).** Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.*, 270: 28495.
- Newton A.C. (1997).** Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9: 161.
- Newton A. C. (2003).** Regulation of the ABC kinase by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.*, 370: 361-371.
- Nicotera P., Bellomo G. & Orrenius S. (1992).** Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.*, 32: 449-470.

- Nishizuka Y. (1986).** Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233: 305.
- Nishizuka Y. (1992).** Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258: 607-614.
- Nishizuka Y. (1995).** Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, 9: 484.
- Nowak G. (2002).** PKC- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 43377-43388.
- Olesen J. (1988).** Calcium entry blockers in the treatment of vertigo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 522: 690-697.
- Oltvai Z. N. & Korsmeyer S. J. (1994).** Checkpoints of duelling dimers foil death wishes. *Cell*, 79: 189-192.
- Ormerod M. G., O'Neill C. F. Robertson D. & Harrap D. (1994).** Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line, without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp. Cell Res.*, 211: 231-237.
- Orrenius S., McCabe M. J. Jr. & Nicotera P. (1992).** Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol. Lett.*, 64-65: 357-364.
- Orrenius S., Zhivotovsky B. & Nicotera P. (2003).** Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nature*, 4: 552-565.
- Osborn M. T. & Chambers T. C. (1996)** Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J. Biol. Chem.*, 271: 30950-30955.
- Ozturk G., Anlar O., Erdogan E., Kosem M., Ozbek H. & Turker A. (2004).** The effects of Ginkgo extract EGb761 in cisplatin-induced peripheral neuropathy in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 196 (1): 169-175.
- Parker P. J. & Dekker L. V. eds (1997).** *Protein Kinase C*, Springer-Verlag: London.
- Pauwels P. J., Leysen J. E. & Janssen P. A. (1991)** Ca²⁺ and Na⁺ channels involved in neuronal cell death. Protection by flunarizine. *Life Sci.*, 48: 1881-1893.
- Pawson T. & Scott J. D. (1997).** Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278: 2075-2080.
- Peluso J. J., Pappalardo A. & Fernandez G. (2001).** Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC δ -dependent pathway. *Endocrinology*, 142: 4203-4211.
- Perez R. P. (1998).** Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer*, 34: 1535-1542.
- Persons D. L., Yazlovitskaya E. M., Cui W. & Pelling J. C. (1999).** Cisplatin-induced Activation of Mitogen-activated Protein Kinases in Ovarian Carcinoma Cells: Inhibition of Extracellular Signal-regulated Kinase Activity Increases Sensitivity to Cisplatin *Clin. Canc. Res.*, 5: 1007-1014.
- Piga R., Saito Y., Chen Z., Yoshida Y. e Niki E. (2005).** Characterization of monochloramine toxicity on PC12 cells and protective effect of tocopherol via antioxidative function. *Arch. Biochem. Biophys.*, 436:101-9.
- Piga R., Saito Y., Yoshida Y. e Niki E. (2007).** Cytotoxic effects of various stressors on pc12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidant.s *Neurotoxicol.*, 28: 67-75
- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M. D. & Ramacle J. (1990).** Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.*, 51: 283-297.
- Pirvola U., Xing-Qun L. Virkkala J. Saarna M. Murakata C. Camoratto A. M. Walton K. M. & Ylikoski J. (2000).** Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Neurosci.*, 20: 43-50.
- Plummer M. R., Logothetis D. E. & Hess P. (1989).** Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron*, 2: 1453-1463.
- Poelaert J. & Roosens C. (2000).** Perioperative use of dihydropyridine calcium channel blockers. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 44: 528-35.
- Pongracz J., Tuffley W., Johnson G. D., Deacon E. M. Burnett D., Stockley R. A. & Lord J. M. (1995).** Changes in Protein kinase C isoenzyme expression associated with apoptosis in U937 myelomonocytic cells. *Exp. Cell Res.*, 218: 430-438.
- Poruchynsky M. S., Wang E. E., Rudin C. M., Blagosklonny M. V. & Fojo T. (1998).** Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells

following microtubule disruption. *Cancer Res.*, 58: 3331-3338.

Powell C. T., Brittis N. J., Stec D., Hug H., Heston W. D. W. e Fair W. R. (1996). Persistent membrane translocation of protein kinase Ca during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ.*, 7: 419-428.

Prekeris R., Hernandez R. M., Mayhew M. W., White M. K. & Terrian D. M. (1998). *J. Biol. Chem.*, 273: 26790.

Previati M., Lanzoni I., Corbacella E., Magosso S., Giuffre' S., Francioso F., Arcelli D., Volinia S., Barbieri A., Hatzopoulos S., Capitani S. & Martini A. (2004). RNA expression induced by cisplatin in an organ of Corti-derived immortalized cell line. *Hear. Res.*, 196: 8-18.

Previati M., Lanzoni I., Astolfi L., Fagioli F., Vecchiati G., Pagnoni A, Martini A. & Capitani S. (2007). Cisplatin cytotoxicity in organ of Cortiderived immortalized cells. *J. Cell. Biochem.*, 101: 1185-1197.

Pulverer B. J., Kyriakis J. M., Avruch J., Nikolakaki E. & Woodgett J. R. (1991). Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature*, 353: 670-674.

Quasthoff S. & Hartung H. P. (2002). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurol.*, 249: 9-17.

Rademarker-Lakhai J. M., Crul M., Zuur L., Baas P., Beijnem J. H., Simis Y. J. W., van Zandwijk N. & Schellens J. H. M. (2006). Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J. Clin. Oncol.*, 24 (6): 918-924.

Rao R. V., Peel A., Loqvinova A., Del Rio G., Hermel E., Yokota T., Goldsmith P. C., Ellery L. N., Ellerby H. M. & Bredesen D. E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Let*, 514 (2-3): 122-8.

Rauko O., Novotny L., Dovinova I., Hunakova L., Szekeres T., Jayaram H. N. (2001). Antitumor activity of benzamide riboside and its combination with cisplatin and staurosporine. *Eur. J. Pharmacol. Sci.*, 12: 387-394.

Ravi R., Somani S. M. & Rybak L. P. (1995). Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol. Toxicol.*, 76: 386-394.

Reddel R. R., Kefford R. F., Grant J. M. et al. (1982). Ototoxicity in patients receiving cis-platinum: Importance of dose and

method of drug administration. *Cancer. Treat. Rep.*, 66: 19-23.

Reed J. C. (1997). Cytochrome c: Can't live with it-can't live without it. *Cell*, 91: 559-562.

Reed J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17: 3225-3236.

Reiss N., Hermon J., Oplatka A. & Naor Z. (1996). Interaction of purified protein kinase C with key proteins of energy metabolism and cellular motility. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 38: 711-719.

Reuter H. (1996). Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6: 331-337.

Reyland M. E., Barzen K. A., Anderson S. M., Quissel D. O. & Matassa A. A. (2000). *Cell Death Differ.*, 7: 1200-1209.

Rich K. M. & Hollowell J. P. (1990). Flunarizine protects neurons from death after axotomy or NGF deprivation. *Science*, 248: 1419-1421.

Rivolta M. N., Grix N., Lawlor P., Ashmore J. F., Jagger D. J. & Holley M. C., (1998). Auditory hair cell precursors immortalized from the mammalian ear. *Proc. R. Soc. Lond.*, B 265: 1595-1603.

Rizzuto R., Pinton P., Ferrari D., Chami D., Szabadkai G., Magalhaes P. J., Di Virgilio F. & Pozzan T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*, 22: 8619-8627.

Rosenberg B. (1999). Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in cisplatin. In: *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, (Bernhard Lippert ed.) Wiley-VCH, Basel, Switzerland, pp: 3-27.

Rosenberg B., Van Camp L. & Krigas T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205: 698-699.

Rosse' T., Olivier R., Monney L., Rager M., Conus S., Fellay I., Jansen B. & Borner C. (1998). B1-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391: 496-499.

Rossi G. (1997). *Trattato di otorinolaringoiatria*. Ed. Minerva Medica S.p.A., Torino: pp. 622.

Rossof A. H., Slayton R. E. & Perlia C. P. (1972). Preliminary clinical experience with cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875; CACP). *Cancer*, 30: 1451-1456.

- Ruben R. J. (1967)** Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitosis. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*, 220: 1–44.
- Rukenstein A., Rydel R. E. & Greene L. A. (1991)**. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. *J. Neurosci.*, 11: 2552–2563.
- Ruvolo P. P., Deng X., Carr B. K. & May W. S. (1998)**. A functional role for mitochondrial protein kinase Ca in Bcl2phosphorylation and suppression of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 273: 25436–25442.
- Rybak L. P., Ravi R. & Somani S. M. (1995)**. Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Fundam Appl Toxicol.*, 26: 293–300.
- Rybak L. P., Whitworth C. & Somani S. (1999)**. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope*, 109: 1740–1744.
- Rybak L. P., Husain K., Morris C., Whitworth C. & Somani S. (2000)**. Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am. J. Otol.*, 21: 513–250.
- Rybczynska M., Ksiazek K. & Kaczmarek J. (2000)**. The role of PKC isoforms in tumorigenicity and apoptotic cell death. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 54: 777.
- Saito Y., Yoshida Y., Akazawa T., Takahashi K. & Niki E. (2003)**. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J. Biol. Chem.*, 78: 39428–34.
- Salomoni P., Wasik M. A., Riedel R. F., Reiss K., Choi J. K., Skorski T. & Calabretta B. (1998)**. Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/ABL mutant. *J. Exp. Med.*, 187: 1995–2007.
- Samant S., Kumar P., Wan J. Hanchett C., Vieira F., Murry T., Wong F. S. H. & Robbins K. T. (1999)**. Concomitant radiation therapy and targeted cisplatin chemotherapy for the treatment of advanced pyriform sinus carcinoma: disease control and preservation of organ function. *Head Neck.*, 21: 595–601.
- Santi C. M., Cayabyab F. S., Sutton K. G., Mcrory J. E., Mezeyova J., Hamming K. S., Parker D., Stea A. & Snutch T. P. (2002)**. Differential inhibition on T-type calcium channels by neuroleptics. *J. Neurosci.*, 22: 396–403.
- Sartorius U., Schmitz I. & Kramer, P. H. (2001)**. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem.*, 2: 20–29.
- Sawa A., Khan A. A., Hester L. D. & Snyder S. H. (1997)**. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11669–11674.
- Schaefer M., Albrecht N., Hofmann T., Gudermann T. & Schultz G. (2001)**. Diffusion-limited translocation mechanism of protein kinase C isoforms. *FASEB J.*, 15: 1634–1636.
- Schierle G. S. & Brundin P. (1999)**. Excitotoxicity plays a role in the death of tyrosine hydroxylase-immunopositive nigral neurons cultured in serum-free medium. *Exp. Neurol.*, 157: 338–348.
- Schubert D., Heinemann S., Carlisle W., Tarikas H., Kimes B., Patrick J., Steinbach J. H., Culp W. & Brandt B. L. (1974)**. Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature*, 249, 224–229.
- Scorrano L. & Korsmeyer S. J. (2003)**. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304 (3): 437–44.
- Scorrano L., Ashiya M., Buttler K., Weiler S., Oakes S. A., Mennella C. A. & Korsmeyer S. J. (2002)**. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell*, 2 (1): 55–67.
- Seiler S. M., Arnold A. J. & Stanton H. C. (1987)**. Inhibitor of inositol triphosphate-induced Ca²⁺ release from isolated platelet membrane vesicle. *Biochem. Pharmacol.*, 36: 3331–3337.
- Sha S. H., Taylor R., Forge A. & Schacht J. (2001)**. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hearing Research*, 155: 1–8.
- Shashidharan P., Chalmers-Redman R. M., Carlisle G. W., Rodic V., Gurvich N., Yuen T., Tatton W. G. & Sealfon S. C. (1999)**. Nuclear translocation of GAPDH-GFP fusion protein during apoptosis. *NeuroReport*, 10: 1149–1153.
- Shibasaki F., Kondo E., Akagi T. & McKeon F. (1997)**. Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature*, 386: 728–731.

- Shiozak E. N. & Shi Y. (2004).** Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem. Sci.*, 29 (9): 486-94.
- Sierpina V. S., Wollschlaeger B. & Blumenthal M. (2003).** *Ginkgo biloba*. *American Family Physician*, 68 (5): 923-926.
- Sirover M. A. (1999).** New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1432: 159-184.
- Slee E. A., Harte M. T., Kluck R. M., Wolf B. B., Casiano C. A., Newmeyer D. D., Wang H. G., Reed J. C., Nicholson D. W., Alnemri E. S., Green D. R. & Martin, S. J. (1999).** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.*, 144 (2): 281-92.
- Smeal T., Binetruy B., Mercola D. A., Birrer M. & Karin M. (1991).** Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354, 494-496.
- Smith J. V. & Luo Y. (2004).** Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 465-472.
- Smith P. F., Zheng Y. & Darlington C. L. (2005).** *Ginkgo biloba* extracts for tinnitus: More hype than hope? *J. Ethnopharmacol.*, 100: 95-99.
- So. H. S., Park C., Kim H. J., Lee J. H., Prk S. Y., Lee J. H., Lee Z. W., Kim H. M., Kalinec F., Lim D. J & Prk R. (2005).** Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced death of auditory cells. *Hear. Res.*, 204: 127-139.
- So H. S., Kim H. J., Lee J. H., Lee J. H., Park S. Y., Park C., Kim Y. H., Kim J. K., Lee K. M., Kim K. S., Chung S. Y., Jang W. C., Moon S. K., Chung H. T. & Park . K. (2006).** Flunarizine induces Nrf2-mediated transcriptional activation of heme oxygenase-1 in protection of auditory cells from cisplatin. *Cell Death Differ.*, 13: 1763-1775.
- So H., Kim H., Kim Y., Kim E., Pae H. O., Chung H. T., Kim H. J., Kwon K. B., Lee K. M., Lee H. Y., Moon S. K. & Park R. (2008).** Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via Nrf2/HO-1. *J Assoc Res Otolaryngol.*, 9 (3): 290-306.
- Somani S. M., Husain K., Jagannathan R. & Rybak L. P. (2001).** Amelioration of cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity by protective agents. *Ann. Neurosci.*, 8: 101-113.
- Somlyo A. P. & Somlyo A. V. (1994).** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372: 231-236.
- Sorenson C. M. & Eastman A. (1988a).** Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, 48: 6703-6707.
- Sorenson, C.M. & Eastman, A. (1988b).** Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.*, 48: 4484-4488.
- Spiering E. L. (1988).** Clinical and experimental evidence for a role of calcium entry blockers in the treatment of migraine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 522: 676-689.
- Spitaler M. & Cantrell D. A. (2004).** Protein Kinase C and beyond. *Nature Immunology*, 5 (8): 785-790.
- Spoendlin H. (1972).** Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol.*, 73: 234-248.
- Spoendlin H. (1973).** The innervation of cochlear receptor. In: *Basic mechanisms in hearing*, N. Y. Academy Press: 185-234.
- Srinivasula S. M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R. A., Robbins P. D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y. & Alnemri E. S. (2001).** A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410: 112-6.
- Stabel S. & Parker P. (1991).** Protein kinase C. *J. Pharmacol. Ther.*, 51: 71.
- Strasser A., O'Connor L. & Dixit V. M. (2000).** Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 217-45.
- Standaert M. L., Bandyopadhyay G., Kanoh Y., Sajjan M. P. & Farese R. V. (2001).** Insulin and PIP3 activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry*, 40: 249-255.
- Su Q. J., Chen X. W., Chen Z. B. & Su A. G. (2008).** Involvement of ERK1/2 and p38 MAPK in up-regulation of 14-3-3 protein induced by hydrogen peroxide preconditioning in PC12 cells. *Neurosci. Bull.*, 24 (4): 244-250.
- Sunayama J., Tsuruta F., Masuyama N. & Gotoh Y. (2005).** JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating

14-3-3. *The Journal of Cell Biology*, 170 (2):295-304.

Susin S. A., Lorenzo H. K., Zampami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penniger J. M. and Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718): 441-446.

Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K. & Takahashi R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*, 8: 613-21.

Tajima H., Tsuchiya K., Yamada M., Kondo K., Katsube N. & Ishitani R. (1999). Over-expression of GAPDH induces apoptosis in COS-7 cells transfected with cloned GAPDH cDNAs. *NeuroReport*, 10: 2029-2033.

Takei M., Hiramatsu M. & Mori A. (1994). Inhibitory effects of calcium antagonists on mitochondrial swelling induced by lipid peroxidation or arachidonic acid in the rat brain in vitro. *Neurochem. Res.*, 19: 1199-1206.

Tang S. J., Suen T. C., McInnes R. R. & Buchwald M. (1998). Association of the TLX-2 homeodomain and 14-3-3eta signalling proteins. *J. Biol. Chem.*, 273: 25356-2563.

Temple M. D., Perrone G. G., Dawes I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.*, 15: 319-326.

Teranishi M. A. & Nakashima T. (2003). Effects of trolox, locally applied on round windows, on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 67: 133-139.

Teranishi M., Nakashima T. & Wakabayashi T. (2001). Effects of alpha-tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hear. Res.*, 151: 61-70.

Thai-Van H., Bounaix M. J. & Frayssé B. (2001). Menière's Disease. Pathophysiology and Treatment. *Drugs*, 61 (8):1089-1102

Thomas P. G. & Verkleij A. J. (1990). The dissimilar interactions of the calcium antagonist flunarizine with different phospholipid classes and molecular species: a differential scanning calorimetry study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1030: 211-222.

Thomas P. G., Zimmerman A. G. & Verkleij A. J. (1988). Prevention of calcium-induced membrane structural alteration in erythrocyte membranes by flunarizine. *Biochim. Biophys. Acta.*, 946: 439-444.

Tischler A. S. & Greene L. A. (1978). Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Lab Invest.*, 39: 77-89.

Toker A. (2000). Protein Kinases as Mediators of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling. *Mol. Pharmacol.*, 57: 652-658.

Trevisi M. & Ricci D. (1998). *Anatomia funzionale dell'apparato audio-fonatorio*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano: pp. 129.

Trump B. F. & Berezsky I. K. (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.*, 9: 219-228.

Tsujimoto Y. & Shimizu S. (2000). Bcl-2 regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ.*, 7 (2): 1174-1181.

Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E. & Croce C. M. (1985). The t(14:18) chromosome translocation involved in B cell neoplasia results from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229: 1390-1394.

Turchi J. J. & Henkels K. (1996). Human KU autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 271: 13861-13867.

Vago P., Humbert G. & Lenoir M. (1998). Amakacin intoxication induces apoptosis and cell proliferation in rat organ of Corti. *NeuroReport*, 9: 431-436.

Van de Craen M., Declercq W., Vandenberghe I., Fiers W. & Vandennebeele P. (1999). The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.*, 6: 1117-24.

Van der Hoeven P. C. J., Van der Wal J. C. M., Ruurs P., Van Dijk M. C. M. & Van Blitterswijk W. J. (2000). 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem. J.*, 345: 297-306.

Van Nueten J. M. & Vanhoutte P. M. (1984). Flunarizine. *New Drugs Annual: Cardiovascular Drugs*, 2: 245-266.

Van Ruijven M. W. M., de Groot J. C. M. J., Klis S. F. L. & Smoorenburg G. (2005). Cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hearing Research*, 205: 241-248.

Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J. and Vaux D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by

- binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102 (1): 43-53.
- Verhagen A. M., Silke J., Ekert P. G., Pakusch M., Kaufman H., Connolly L. M., Day C. L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R. L., Simpson R. J. and Vaux D. L. (2002).** HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.*, 277 (1): 445-454.
- Vermes I., Haanen C. & Reutelingsperger C. (2000).** Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*, 243: 167-190.
- Villalba M., Bushway P. & Altman A. (2001).** Protein kinase C mediate a selective T cell survival signalling via phosphorylation of Bad. *J. Immunol.*, 166: 5955-5963.
- Vlahopoulos S. & Zoumpourlis V. C. (2004).** JNK: a key modulator of intracellular signalling. *Biochemistry (Moscow)*, 69 (8): 844-854.
- Voehringer D.W., McConkey D. J., McDonnell T. J., Brisbay S. & Meyn R. E. (1998).** Redox State of Cytochrome c Regulates Cellular ROS and Caspase Cascade in Permeabilized Cell Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 2956-2960.
- Vogelgesang R. & Scheuffler E. (1990).** R56865 and flunarizine displace Ca^{2+} from phosphatidylserine monolayers in stoichiometric manner. *Eur. J. Pharmacol.*, 188: 17-22.
- Vogelgesang R., Wood G., Peter T. & Scheuffler E. (1988).** pH-dependent influence of membrane incorporated flunarizine on Ca^{2+} binding to phosphatidylserine monolayer membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 1597-1600.
- Wada T. & Penninger J. M. (2004).** Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 23: 2838-2849.
- Wang, X. (2001).** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Anticancer Res.*, 19 (6a): 4759-4771.
- Wang H. G., Rapp U. R. & Reed J. C. (1996).** Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, 87: 629-638.
- Wang X., Martindale J. L., Liu Y. & Holbrook N. J. (1998).** The cellular response to oxidative stress: Influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. *Biochem. J.*, 333: 291-300.
- Wang H. G., Pathan N., Ethell I. M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T. F. & Reed J. C. (1999).** Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 284: 339-343.
- Wang X., Martindale J. L. & Holbrook N. (2000).** Requirement for ERK activation in cisplatin induced apoptosis. *J. Biochem. Chem.*, 275 (50): 39435-39443.
- Wang J., De Water V., Bonny C., Ribaupierre F., Puel J. L. & Zine A. (2003a).** A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J. Neurosci.*, 23 (24):8596-8607.
- Wang J., Lloyd Faulconbridge R. V., Fetoni A., Guitton M. J., Pujol R., Puel J. L. (2003b).** Local application of sodium thiosulfate prevents cisplatin-induced hearing loss in the guinea pig. *Neuropharmacology*, 45: 380-393.
- Wang G., Cao F. & Chen J. (2006).** Progress in researches on the pharmaceutical mechanism and clinical application of *Ginkgo biloba* extract on various kinds of diseases. *Chin. J. Integr. Med.*, 12: 234-239.
- Ward M. W., Kogel D. & Prehn J. H. (2004).** Neuronal apoptosis: BH3-only proteins the real killers. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36 (4): 295-8.
- Watanabe T., Ono Y., Taniyama Y., Hazama K., Igarashi K., Ogita, K., Kikkawa U. & Nishizuka Y. (1992).** Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10159-10163.
- Watanabe K., Hess A., Michel O. & Yagi T. (2000).** Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin-treated cochlea of guinea pigs. *Anticancer Drugs*, 11: 731-735.
- Watanabe K., Jinnouchi K. & Yagi T. (2001).** Detection of singlestranded DNA (ssDNA) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatin (CDDP). *Anticancer Res.*, 21: 1135-1138.
- Wert M. M. & Palfrey H. C. (2000).** Divergence in the anti-apoptotic signaling pathways used by nerve growth factor and basic fibroblast growth factor (bFGF) in PC12 cells: rescue by bFGF involves protein kinase C δ . *Biochem. J.*, 352: 175-182.
- Whelan R. D. H. & Parker P. J. (1998).** Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene*, 16: 1939-1944.
- Widmann C., Gerwins P., Johnson N. L., Jarpe M. B. & Johnson G. L. (1998a).** MEK Kinase 1, a Substrate for DEVD-Directed

- Caspases, Is Involved in Genotoxin-Induced Apoptosis *Mol. Cell Biol.*, 18: 2416-2429.
- Widmann C., Gibson S. & Johnson G. L. (1998b).** Caspase dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis-A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem.*, 273: 7141-7147.
- Wilson D. J., Fortner K. A., Lynch D. H., Mattingly R., Macara I. G., Posada J. A. & Budd R. C. (1996).** JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.*, 26: 989-994.
- Windebank A. J., Smith A. G. & Russell J. W. (1994).** The effect of nerve growth factor, ciliary neurotrophic factor, and ACTH analogs on cisplatin neurotoxicity in vitro. *Neurology*, 44: 488-494.
- Woessmann W., Chen X. & Borkhardt A. (2002).** Ras mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, 50: 397-404.
- Wolter K. G., Hsu Y. T., Smith C. L., Nechustan A., Xi X.G. & Youle R. J. (1997).** Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139: 1281-1292.
- Wood D. E., Thomas A., Devi L. A., Berman Y., Beavis R. C. & Reed J. C. Yr. (1998).** Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 17: 1069-1078.
- Wu W. J., Sha S. H., McLaren J. D., Kawamoto K., Raphael Y. & Schacht J. (2001).** Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear. Res.*, 158: 165-178.
- Wyllie, A. H. a. D. E. (1992).** Danno e morte cellulare. In: *Patologia I: i principi*, Zanichelli Editore (1995), 1(3): 177-226.
- Wyllie A. H., Kerr J.F. R. & Currie A. R. (1980).** Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306.
- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. & Greenberg M. (1995).** Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science*, 270: 1326-1331.
- Xinag H., Zhang S., Weinheimer C., Kovacs A. & Muslin A.J. (2000).** 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.*, 19: 349-358.
- Xu O., Lu H., Li P. Q., Zhang X. & Lu Z. (2004).** Effect of combination of ginkgo leaf extract and deferoxamine in preventing and treating ototoxicity of cisplatin. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 24 (10): 915-918.
- Yaffe M. B., Rittinger K., Volinia S., Caron P. R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S. J., Smerdon S. J. & Cantley L. C. (1997).** The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 87: 619-628.
- Yamoha E. N., Lumpkin E. A., Dumont R. A., Smith P. J., Hudspeth, A. J. & Gillespie P. G. (1998).** Plasma membrane Ca²⁺-ATP-ase extrudes Ca²⁺ from hair cell stereocilia. *J. Neurosci.*, 18: 610-624.
- Yang E. & Korsmeyer S. J. (1996).** Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88: 386-401.
- Yang S. E., Hsieh M. T., Tsai T. H. & Hsu S. L. (2003).** Effector mechanism of magnolol-induced apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *British J. Pharmacol.*, 138: 193-201.
- Yoon S. & Seger R. (2006).** The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24: 21-44.
- Yoshida K., Inui M., Harada K., Saido T. C., Sorimachi Y., Ishihara T., Kawashima S. & Sobue K. (1995).** Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ. Res.*, 77: 603-610.
- Yoshizumi M., Tsuchiya K. & Tamaki T. (2001).** Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen activated protein kinases in cardiovascular disease. *J. Med. Invest.*, 48: 11-24.
- Zamble D. B., Jacks T. & Lippard S. J. (1998).** p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6163-6168.
- Zanke B. W., Boudreau K., Rubie E., Winnet E., Tibbles L. A., Zon L., Kyriakis J., Liu F. F. & Woodgett J. R. (1996).** Stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.*, 6: 606-613.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. & Korsmeyer S. J. (1996).** Serine phosphorylation of death agonist bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-xl. *Cell*, 87: 619-628.
- Zhang L., Chen J. & Fu H. (1999).** Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96: 8511-8515.

Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O. T. & Doskeland S. O. (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature*, 391: 449-450.

Zhou L. J. & Zhu X. Z. (2000). Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J. Pharmacol. Experiment. Therapeut.*, 293 (3): 982-988.

Zhuang S. & Schnellman R. G. (2006). A death-promoting role of extracellular signal-regulated kinase. *J. Pharmacol. Experiment. Therapeut. Fast. Forw.*, 319:991-997.

Zoratti M. & Szabo I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241: 139-76.

Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A. & Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90: 405-413.

Zrachia A., Dobroslav M., Blass M., Kazimirsky G., Kronfeld I., Blumberg P. M., Kobiler D., Lustig S. & Brodie C. (2002). Infection of glioma cells with Sindbis virus induces selective activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase C δ . Implications for Sindbis virus-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 277: 23693-2370.