



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
"SCIENZE BIOMEDICHE"

CICLO\_XXIII-

COORDINATORE Prof. S.Capitani

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL DEXAMETASONE E DEL  
CISPLATINO NEI MODELLI SPERIMENTALI IN VITRO (OC-K3) E IN VIVO  
(RATTI WISTAR)

Settore Scientifico Disciplinare MED/32

**Dottorando**  
Dott. PANNELLA MICAELA

  
(firma)

**Tutore**  
Prof. GRANIERI ENRICO  
Prof. MARTINI ALESSANDRO

  
(firma)

Anni 2008/2010

## Sommario

1 INTRODUZIONE .....	6
1.1 APPARATO Uditivo .....	8
1.1.1 ORECCHIO ESTERNO .....	9
1.1.2 ORECCHIO MEDIO .....	10
1.1.3. ORECCHIO INTERNO .....	11
1.1.3.1 COCLEA .....	12
1.1.3.2 LABIRINTO OSSEO .....	12
1.1.3.3 LABIRINTO MEMBRANOSO .....	14
1.1.3.4 ORGANO DEL CORTI .....	16
1.1.3.5 IL GANGLIO SPIRALE .....	19
1.1.3.6 TRASMISSIONE E TRASDUZIONE DEL SUONO .....	21
1.1.3.7 DISCRIMINAZIONE DELLE FREQUENZE .....	22
1.2 OTOTOSSICITA' .....	23
1.2.1 CISPLATINO.....	24
1.2.2 MECCANISMO D'AZIONE.....	26
1.2.3 TOSSICITÀ DEL CISPLATINO .....	27
1.3 APOPTOSI .....	29
1.3.1 CASPASI .....	30
1.3.2 LE VIE APOPTOTICHE .....	32
1.3.3 VIA INTRINSECA .....	34
1.3.4 VIA ESTRINSECA.....	36
1.4 EFFETTO PROTETTIVO DEL DEXAMETASONE DAI DANNI INDOTTI DAL CISPLATINO .....	38
1.4.1 I GLUCOCORTICOIDI.....	38
1.4.2 DEXAMETASONE.....	39
1.4.3 MECCANISMO D'AZIONE DEL DEXAMETASONE .....	42
1.5 MODELLI SPERIMENTALI.....	44
1.5.1 MODELLO SPERIMENTALE IN VIVO .....	44
1.5.2 UTILIZZO DI COLTURE CELLULARI PER LO STUDIO DELLA OTOTOSSICITA' E DELLA PROTEZIONE IN VITRO .....	46
1.5.3 MODELLO CELLULARE IN VITRO OC-K3.....	47
1.5.4 MODELLO SPERIMENTALE IN VITRO HUMAN FETAL AUDITORY STEM CELLS (hFASC) .....	50

1.5.4.1 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DELLE HUMAN FETAL STEM CELLS (hFASC) .....	50
1.5.4.2. HUMAN FETAL AUDITORY STEM CELLS (hFASC) POSSONO ESSERE DIFFERENZIATE IN NEURONI E IN CELLULE CIGLIATE.....	51
1.6 TERAPIA GENICA .....	52
1.6.1 I TRASPOSONI.....	53
1.7 SCOPO DELLA RICERCA .....	57
2 MATERIALI E METODI .....	59
2.1 L'EFFETO PROTETTIVO <i>IN VITRO</i> DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO .....	59
2.1.1 MODELLO CELLULARE OC-k3 .....	60
2.1.2 TEST DI TOSSICITA' E PROTEZIONE SULLE OC-k3 MEDIANTE CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO .....	60
2.1.3 STUDIO MORFOLOGICO DEL CITOSCHELETRO E DELLA CONDENSANZA DELLA CROMATINA.....	63
2.1.4 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI PATHWAYS APOPTOTICI .....	65
2.2 L'EFFETO PROTETTIVO <i>IN VIVO</i> DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO .....	68
2.2.1 INDAGINE MORFOLOGICA:MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).....	70
2.2.2 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER STRUTTURALI E DEI PATHWAYS APOPTOTICI .....	71
2.3 MESSA A PUNTO DEL SISTEMA DI TRASFEZIONE NON VIRALE.....	73
2.3.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI TRASFEZIONE.....	74
2.3.1.1 COLTURA CELLULARE DELLE HUMAN FETAL AUDITORY STEM CELLS .....	74
2.3.1.2 MESSA A PUNTO DEL SISTEMA DI TRASFEZIONE NON VIRALE .....	75
2.3.2 VERIFICA DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER DELLE CELLULE STAMINALI INDIFEFRENZIATE .....	78
2.3.3 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC TRASFETTATE IN NEURONI BIPOLARI E CELLULE SIMILI ALLE CELLULE STAMINALI.....	79
2.3.3.1 EFFICIENZA DI TRASFEZIONE DELLE hFASC UTILIZZANDO LA MIGLIORE CONCENTRAZIONE DI PLASMIDI .....	79
2.3.3.2 SELEZIONE DELLE hFASC .....	80
2.3.3.3 DIFFERENZIAZIONE DELLE hFASC IN NEURONI BIPOLARI E CELLULE SIMILI ALLE CELLULE CIGLIATE.....	81

2.3.3.3.1	DIFFERENZIAMENTO DELLE hfASC IN NEURONI BIPOLARI	81
2.3.3.3.2	DIFFERENZIAMENTO DELLE hfASC IN CELLULE SIMILI IN CELLULE CIGLIATE .....	82
2.4.	INDAGINE STATISTICA .....	83
3	RISULTATI .....	84
3.1.	L'EFFETTO PROTETTIVO <i>IN VITRO</i> DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO .....	84
3.1.1	TEST DI TOSSICITÀ E PROTEZIONE SULLE OC-k3 MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO .....	84
3.1.1.1	TEST DI TOSSICITÀ DEL CISPLATINO.....	84
3.1.1.2	TEST DI TOSSICITÀ DEL DEXAMETASONE .....	86
3.1.1.3	TEST DI PROTEZIONE DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO.....	87
3.1.2	STUDIO MORFOLOGICO DEL CITOSCHELETRO E DELLA CONDENSAZIONE DELLA CROMATINA.....	90
3.1.3	STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI PATHWAYS APOPTOTICI .....	93
3.2.	L'EFFETTO PROTETTIVO <i>IN VIVO</i> DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO .....	97
3.2.1	INDAGINE MORFOLOGICA:MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).....	97
3.2.2	STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER STRUTTURALI E DEI PATHWAYS APOPTOTICI .....	100
3.3	MESSA A PUNTO DEL SISTEMA DI TRASFEZIONE NON VIRALE.....	105
3.3.1	OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI TRASFEZIONE.....	105
3.3.2	VERIFICA DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER DELLE CELLULE STAMINALI INDIFFERENZIATE .....	109
3.3.3	DIFFERENZIAMENTO DELLE hfASC TRASFETTATE IN NEURONI BIPOLARI E CELLULE SIMILI ALLE CELLULE STAMINALI.....	112
3.3.3.1	EFFICIENZA DI TRASFEZIONE DELLE hfASC UTILIZZANDO LA MIGLIORE CONCENTRAZIONE DI PLASMIDI .....	112
3.3.3.2	SELEZIONE DELLE hfASC .....	114
3.3.3.3	DIFFERENZIAMENTO DELLE hfASC IN CELLULE SIMILI ALLE CELLULE CIGLIATE E IN NEURONI BIPOLARI .....	116
4	DISCUSSIONE .....	118
4.1	EFFETTO PROTETTIVO DEL DEXAMETASONE RISPETTO ALLA TOSSICITÀ DEL CISPLATINO NEL MODELLO <i>IN VITRO</i> .....	118

4.2 EFFETTO PROTETTIVO DEL DEXAMETASONE RISPETTO ALLA TOSSICITA' DEL CISPLATINO NEL MODELLO <i>IN VIVO</i> .....	122
4.3 TRASFEZIONE DELLE hFASC UTILIZZANDO UN NUOVO METODO DI TRASFEZIONE NON VIRALE BASATO SULL' ELEMENTO TRASPONIBILE <i>SLEEPING BEAUTY</i> .....	125
5 CONCLUSIONI .....	128
5.1 CONCLUSIONI LAVORO <i>IN VITRO</i> .....	128
5.2 CONCLUSIONI DEL LAVORO <i>IN VIVO</i> .....	129
5.3 CONCLUSIONI LAVORO <i>IN VITRO</i> . TRASFEZIONE DELLE hFASC CON L'ELEMENTO TRASPONIBILE <i>SLEEPING BEAUTY</i> .....	130
6. BIBLIOGRAFIA .....	131

## **1 INTRODUZIONE**

La perdita di udito è un problema che affligge circa 250 milioni di persone nel mondo (Who., 2005) e si pensa che entro il 2050 il numero aumenterà fino a 900 milioni di persone (Vio et al., 2005).

La perdita di udito è una patologia cronica molto diffusa, subito dopo l'artrite e l'ipertensione (Hazard., 1990).

Le cause possono essere l'esposizione ripetuta a forti rumori, l'aumento dell'età della vita media oppure l'utilizzo di farmaci ototossici come i chemioterapici (Van Rujistan et al., 2005) e aminoglicosidi (Huizing et al., 1987).

Le conseguenze che ne derivano comportano molti disagi dal punto di vista sociale, in quanto porta a considerevoli difficoltà nella comunicazione, una riduzione del benessere fisico e psicologico con conseguente solitudine e depressione (Cohen., 2005).

La perdita dell'udito è un grosso problema anche dal punto di vista economico, infatti solo negli USA la spesa sanitaria per affrontare i disordini di comunicazione è di 154-186 miliardi di dollari. Per quanto riguarda il mercato degli aiuti digitali per l'udito la spesa è di circa 8 miliardi di dollari.(Vio et al., 2005).

Dal punto di vista fisiologico è stato dimostrato che la sordità è dovuta a una alterazione del tessuto neurosensoriale dell'orecchio interno, visto che quest'ultimo non è in grado di rigenerarsi risulta fondamentale studiare sostanze utili a proteggere o prevenirne il danneggiamento e,

nell'ultimo decennio, affianco all'approccio farmacologico si stanno considerando applicazioni di terapia genica e di cellule staminali (Rivolta et al., 2008). Per affrontare questa problematica e si è notato che il

trapianto di cellule staminali che potenzialmente si differenziano in diversi tipi di cellule potrebbe essere una eccellente strategia per il trattamento di danni uditivi (Li et al,2004; Li et al, 2008).

## 1.1 APPARATO Uditivo

L'apparato uditivo è deputato alla ricezione del suono (funzione uditiva) e dell' equilibrio (funzione vestibolare). Dal punto di vista anatomico comprende l'Orecchio Esterno (OE: padiglione auricolare e condotto uditivo), l'Orecchio Medio (OM: membrana timpanica, cassa del timpano, la catena ossiculare e tuba di Eustachio), l'Orecchio Interno (OI: coclea e apparato vestibolare). (Trevisi and Ricci., 1998) (Fig.1).

Dal punto di vista funzionale (la ricezione e codificazione del segnale acustico) si descrive in tre differenti sistemi:

- 1) sistema di trasmissione o conduzione meccanica del suono che coinvolge : il padiglione, il condotto uditivo, l'apparato timpano-ossiculare e le strutture membranose della coclea
  - 2) sistema di trasformazione degli stimoli sonori in impulsi bio-elettrici, che si esprime a livello dell'organo del Corti
  - 3) sistema di codificazione e decodificazione del messaggio bio-elettrico che si sviluppa dal nervo acustico alle vie acustiche centrali.
- (Trevisi and Ricci., 1998)

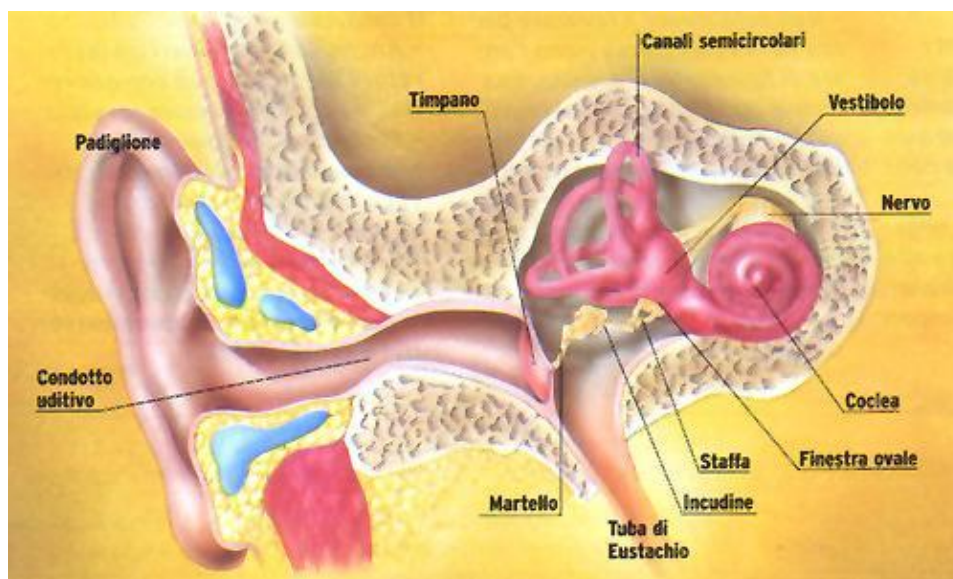


Fig.1:Schema dell'apparato uditivo ([www.cdila.it](http://www.cdila.it))



### 1.1.1 ORECCHIO ESTERNO

L'orecchio esterno rappresenta l'insieme delle componenti che funzionano da "antenna acustica". Il padiglione acustico raccoglie le onde sonore dal campo libero e le convoglia all'orecchio medio attraverso il condotto uditivo esterno. (Trevisi and Ricci., 1998)

L'irregolare forma del padiglione è utile alla ricezione degli sfasamenti delle onde sonore che sono importanti per la localizzazione mono-biauricolare delle sorgenti sonore. La stretta ed estesa forma del condotto uditivo permette la protezione della membrana timpanica, poiché regola la distribuzione della pressione sonora apportando un guadagno acustico soprattutto delle alte frequenze (Rayleigh, 1876; Steward, 1914; Teranishi and Shaw, 1968; Shaw, 1973)(Fig.2).

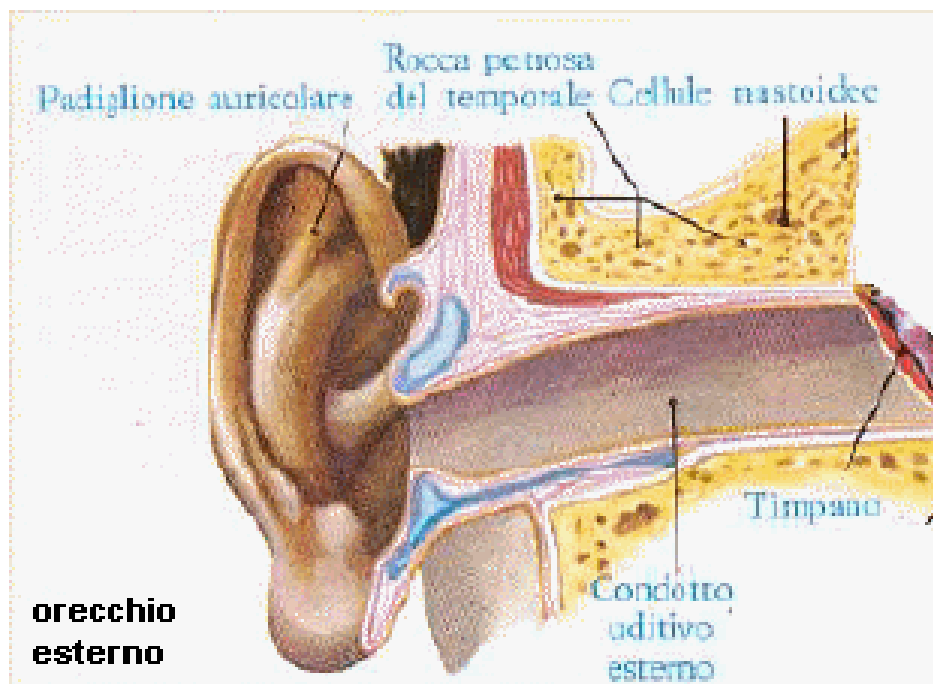


Fig 2.Schema dell'Orecchio Esterno ([www.med.unipi.it](http://www.med.unipi.it))

### 1.1.2 ORECCHIO MEDIO

L'orecchio medio è definito come una camera pneumatica (detta camera timpanica o cassa timpanica) le cui strutture sono atte ad amplificare il segnale acustico ricevuto dall'orecchio esterno e a trasmetterlo all'orecchio interno. (Trevisi and Ricci., 1998)

Nella cassa timpanica si trovano la tuba di Eustachio e l'apparato ossiculare composto da tre ossicini (incudine, martello e staffa). La tuba di Eustachio, permette di mantenere la pressione all'interno della camera timpanica pari alla pressione atmosferica, in modo tale da proteggere la membrana del timpano dall'azione dell'onda sonora. I tre ossicini sono articolati in modo da costituire un'ansa sospesa tra le pareti della cassa. Sono fissati col braccio laterale (martello) alla membrana del timpano e col braccio mediale (staffa) alla finestra rotonda. (fig.3) (Trevisi and Ricci., 1998).

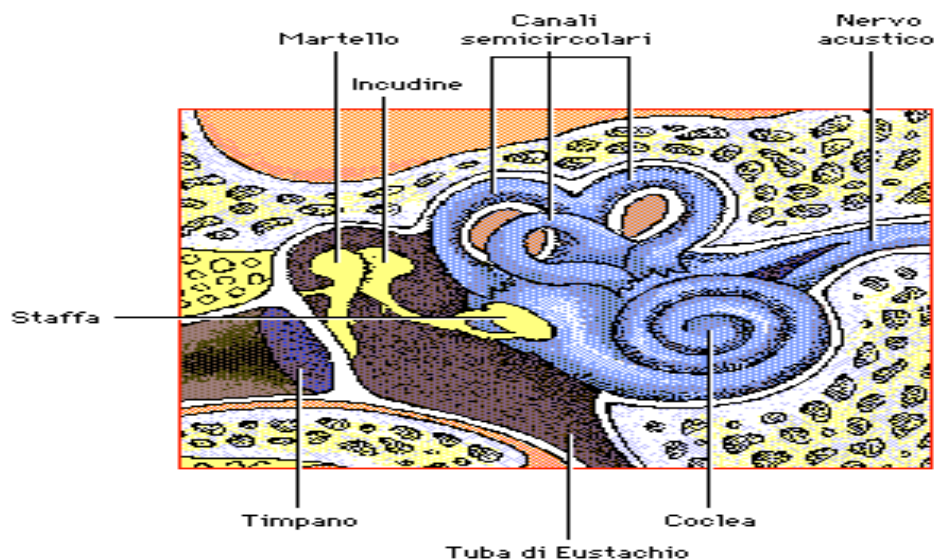


Fig 3 Schema dell'Orecchio Medio (<http://fisica.cib.na.cnr.it>)

### 1.1.3. ORECCHIO INTERNO

L'orecchio interno è situato nella rocca petrosa dell'osso temporale esso contiene un insieme di cavità fra loro comunicanti formate dal labirinto osseo, al cui interno si trova il labirinto membranoso.

Il labirinto osseo è diviso in una porzione posteriore (vestibolare) e in una anteriore (acustica). Il labirinto osseo posteriore comprende il vestibolo, i canali semicircolari ossei e l'acquedotto del vestibolo. Il labirinto osseo anteriore è costituito dalla chiocciola (coclea) ossea e dall'acquedotto della chiocciola.(Fig4) (Trevisi and Ricci., 1998).

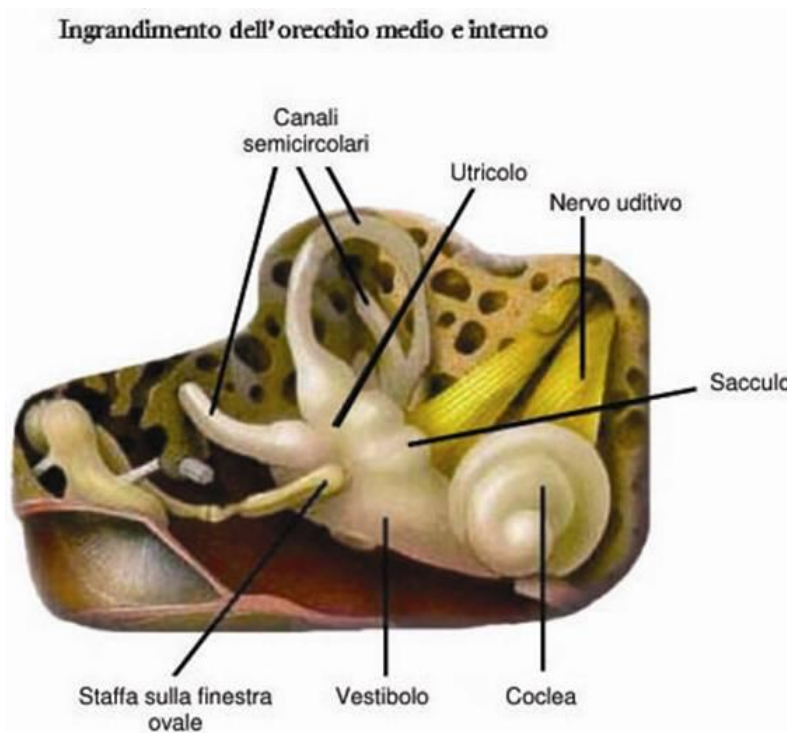


Fig 4 Schema del labirinto osseo ([www.lucaleggi.it](http://www.lucaleggi.it))

### ***1.1.3.1 COCLEA***

### ***1.1.3.2 LABIRINTO OSSEO***

Il labirinto osseo, detto anche chiocciola o coclea, deve il nome alla sua particolare forma. Nella parte centrale la chiocciola presenta una struttura ossea a forma di cono chiamata modiolo e columella, ricca di cavità che raccoglie vasi e fibre nervose. (Alajmo., 1989).

Intorno al modiolo si avvolge un canale osseo (canale spirale) che dalla base all'apice compie quasi tre giri completi (giro basale, medio e apicale). Si avvolge in senso orario nell'orecchio sinistro e in senso antiorario nell'orecchio destro. Il canale spirale ha origine dal vestibolo ed il suo giro basale forma, a livello della parete mediale della cassa, la prominente ossea detta promontorio. Nell'uomo il canale ha una lunghezza di circa 35 mm ed un diametro massimo alla base di 2mm che andando verso l'apice si restringe e appiattisce gradualmente. Dal modiolo, lungo il canale spirale, si diparte una lamina ossea (lamina spirale) che sporge nel lume del canale osseo. All'apice della chiocciola, la lamina spirale termina ad uncino lasciando un orifizio circolare libero (elicotrema) (Fig 5) (Alajmo., 1989).

La base della lamina spirale, a livello dell'inserzione sul modiolo, è percorsa da un canale osseo (canale spirale o di Rosenthal) che contiene le cellule nervose gangliari.

Nel canale spirale sfociano dei canalini longitudinali che contengono le fibre del nervo acustico, questi seguono l'asse del modiolo fino al tratto spirale foraminoso del meato acustico interno. Dal canale spirale si dipartono anche dei canalini radiali che seguono l'asse della lamina spirale, entro cui decorrono le fibre nervose che raggiungono il neuroepitelio dell'Organo del Corti. (Alajmo., 1989).

Il condotto uditivo o meato acustico interno è un canale osseo attraverso il quale passano l'VIII ed il VII nervo cranico e l'arteria uditiva interna. Quest'ultima si suddivide in tre rami terminali (cocleare, vestibolare e cocleo-vestibolare) che raggiungono il labirinto membranoso assieme ai vari rami nervosi. (Alajmo., 1989).

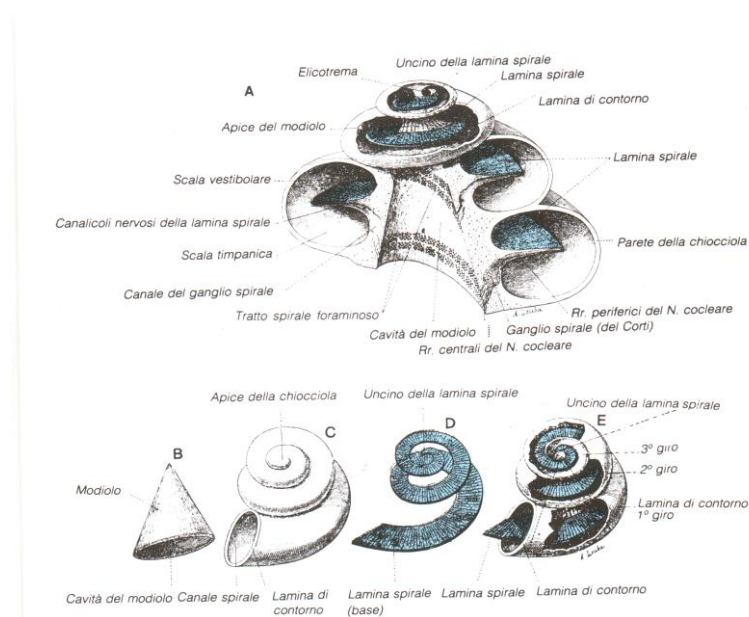


Fig 5 Schemma della coclea: A: sezione della coclea ossea, B: immagine del modiolo, C: rappresentazione della coclea esterna ossea, D: immagine della lamina spirale, E: immagine della disposizione della lamina basale dentro la coclea ossea.

(Alajmo., 1989).

### ***1.1.3.3 LABIRINTO MEMBRANOSO***

La parte membranosa della chiocciola è costituita dal canale cocleare. È un condotto chiuso che inizia nel vestibolo, a livello del sacco, decorre nel lume della chiocciola assumendo lo stesso andamento a spirale della parte ossea e termina a fondo cieco a livello dell'elicotrema. Il condotto ha una sezione triangolare delimitata da tre pareti: la membrana del Reissner, la membrana basilare e la stria vascolare. Si diparte dalla lamina spirale sulla quale poggia la membrana basilare, che lo separa nella regione inferiore dalla scala timpanica. La membrana del Reissner, invece, lo separa nella regione superiore dalla scala vestibolare (Alajmo, 1989).

La parete laterale del condotto è sostenuta dal ligamento spirale, che è un ispessimento dell'endostio della parete ossea laterale (lamina di contorno) della chiocciola. La stria vascolare si trova su questa parete ed è costituita da un epitelio pluristratificato. Le cellule superficiali cilindriche di quest'ultimo tessuto instaurano contatti con una ricca rete di capillari che la circondano. La stria vascolare ha un'elevata attività metabolica (con consumo di  $O_2$  superiore a quello del tessuto cerebrale). Essa partecipa alla produzione di endolifa dove mantiene una alta concentrazione di ioni  $K^+$ , determinando così una alta differenza di potenziale con la perilinfia, che è ricca di  $Na^+$ . (Alajmo., 1989).

Come anzidetto, la parete superiore del canale cocleare è la membrana di Reissner, questa è molto sottile ed è costituita da una lamina connettivale di fini fibre elastiche, rivestita sulle due facce da uno strato cellulare. La parete inferiore del canale cocleare, invece, è più complessa in quanto comprende la membrana basilare (vera lamina vibrante della coclea e sostegno dell'Organo del Corti), l'Organo del Corti (neuroepitelio

sensoriale della coclea) e la membrana tectoria (lamina che stimola le cellule neurosensoriali cigliate). La membrana basilare è un nastro fibroso costituito da tre strati cellulari, che unisce il margine libero della lamina spirale ossea con la base del ligamento spirale. Dalla base all'apice della coclea la larghezza della membrana basilare aumenta gradualmente, mentre il suo spessore diminuisce (Fig 6) (Alajmo., 1989).

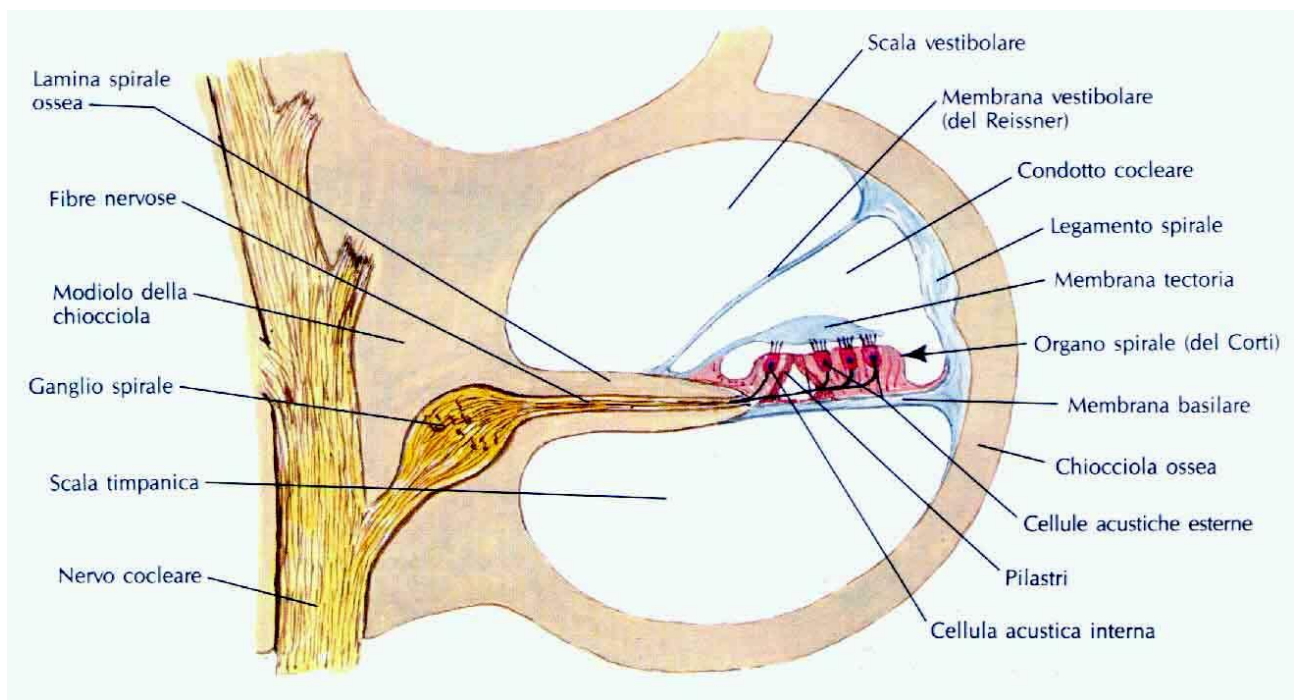


Fig 6 sezione della coclea (www.infosordita.it)

#### 1.1.3.4 ORGANO DEL CORTI

L'Organo del Corti è costituito dalle cellule sensoriali, responsabili della ricezione e trasduzione dell'onda sonora, sorrette da cellule di sostegno.

Esso è posizionato sulla membrana basilare ed è percorso longitudinalmente da un canale interno di sezione triangolare (galleria del Corti), a sua volta delimitato da due diversi tipi di cellule di sostegno: pilastri interni e pilastri esterni. Questa galleria suddivide l'Organo del Corti in due parti, una interna (verso il modiolo) e una esterna (verso la parete laterale del canale cocleare). Nella porzione interna si trovano le cellule di sostegno di ordine I e II sopra le quali, lungo la spirale, si trova una fila di 3500 cellule cigliate interne. Nella porzione esterna si hanno le cellule di sostegno di ordine I, II e III; queste sono molto più numerose e tra esse sono collocate tre file di 12000 cellule cigliate esterne. Tra le cellule di sostegno vi sono altri due tipi di cellule: le cellule del Claudius e le cellule di Hensen (Fig 7). (Alajmo., 1989).

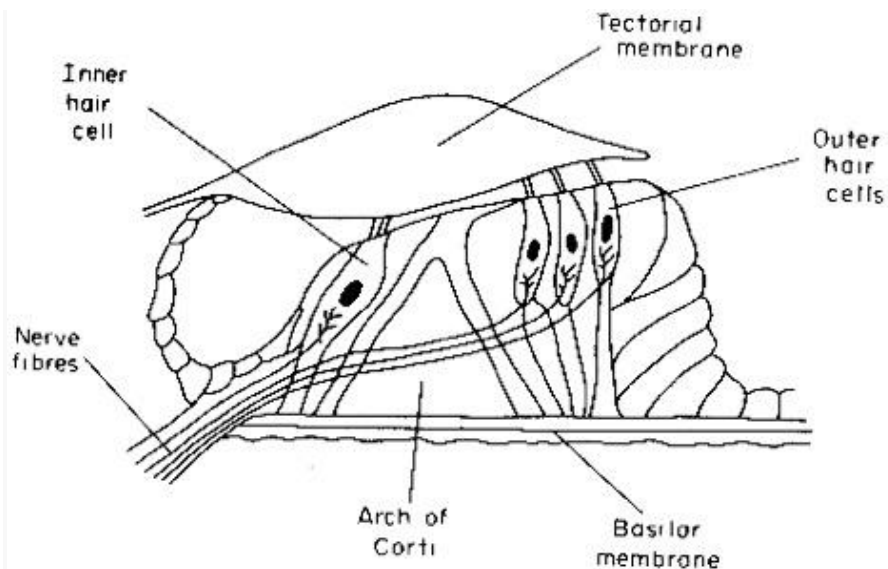


Fig 7 schema dell'Organo del Corti (<http://psicologiapercepcion.blogspot.com>)



Le cellule cigliate (Inner Hair Cells, IHC) interne mostrano nella parte apicale dei microvilli (ciglia) distribuiti a formare una U. La base delle cellule cigliate effettua delle sinapsi con le fibre nervose afferenti ed efferenti, un'unica cellula cigliata effettua sinapsi con più fibre nervose. (Alajmo., 1989).

Le cellule cigliate esterne (Outer Hair Cells, OHC) presentano nella parte apicale numerosi microvilli (ciglia) disposti a formare una W, che diventano più corti andando dalla periferia al centro della cellula. L'apice delle ciglia è a contatto con la membrana tectoria. Questa membrana è molto elastica ed è capace di deformarsi molto facilmente sotto la spinta pressoria della perilinfa. Le cellule cigliate esterne compiono sinapsi con le fibre nervose efferenti e più cellule cigliate compiono sinapsi con una sola fibra nervosa. (Alajmo., 1989).

L'insieme delle fibre nervose costituiscono il ganglio spirale, il quale è situato nel canale del Rosenthal ed è costituito da cellule nervose bipolari (Fig 8) (Alajmo., 1989).

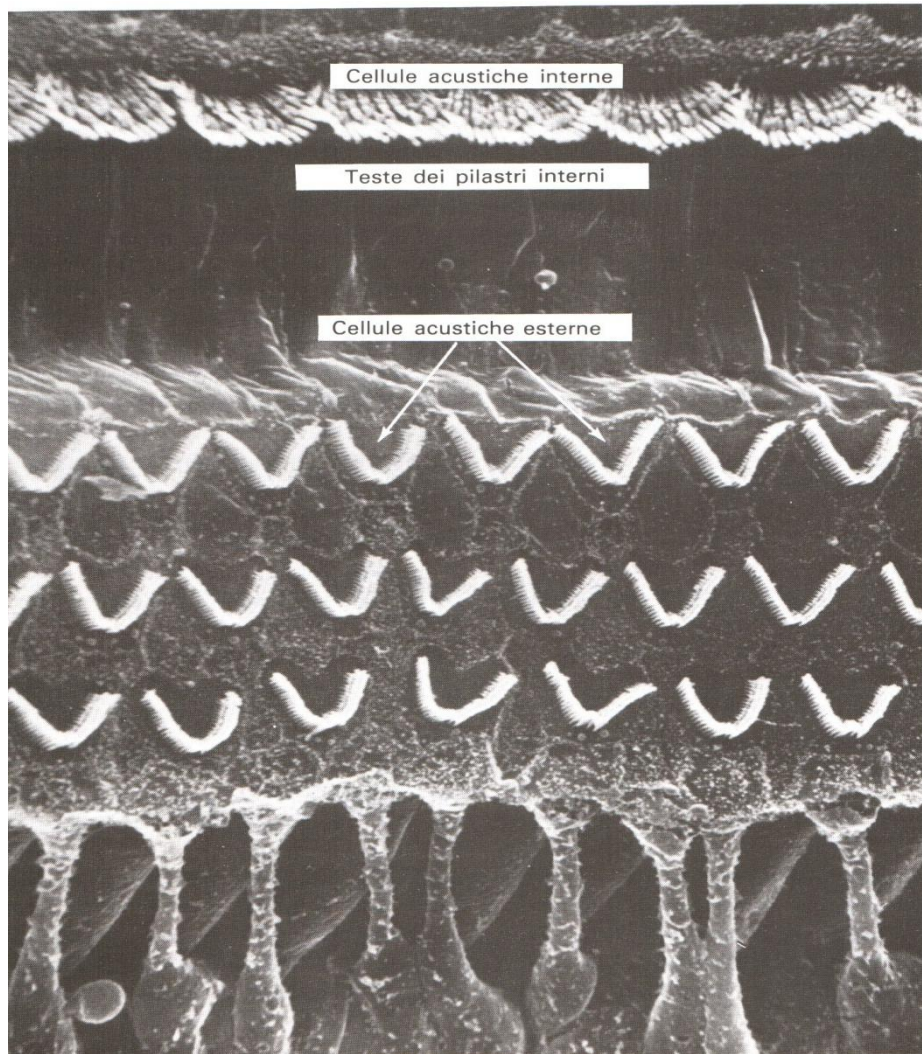


Fig 8 Immagine a microscopio elettronico a scansione dell'Organo del Corti. Evidenza delle cellule cigliate interne e d esterne (Alajmo., 1989).

### ***1.1.3.5 IL GANGLIO SPIRALE***

Dal punto di vista ultrastrutturale nel ganglio spirale si riconoscono due differenti tipi di cellule di tipo I e II (Trevisi and Ricci., 1998).

Le cellule di tipo I sono il 90-95%, hanno un grande diametro (questo varia tra le diverse porzioni della coclea), sono bipolari e presentano un nucleo tondeggiante in posizione centrale con un evidente nucleolo. Il soma cellulare, come gli assoni, è avvolto dalla mielina e nel citosol vi è un'abbondante presenza di reticolo endoplasmatico rugoso. Questi neuroni sono atti esclusivamente all'innervazione afferente delle cellule uditive interne: perdono le guaine mieliniche nell'habendula perforata e sinaptano con una sola cellula uditiva interna, su ciascuna di esse convogliano circa 20 fibre radiali (Trevisi and Ricci., 1998).

Le cellule di tipo II sono cellule pseudounipolari e rappresentano circa il 5-10% delle cellule gangliari; si trovano in tutti i giri della coclea dove si distribuiscono singolarmente o in piccoli gruppi. Il citosol è ricco di neurofilamenti, il soma, come gli assoni, benchè avvolto dalla mielina manca delle regolari e ripetute linee più dense della mielina compatta, motivo per cui vengono definite fibre amieliniche. Ciascuna fibra nervosa è in grado di innervare circa 10 cellule uditive esterne (Fig 9) (Trevisi and Ricci., 1998).

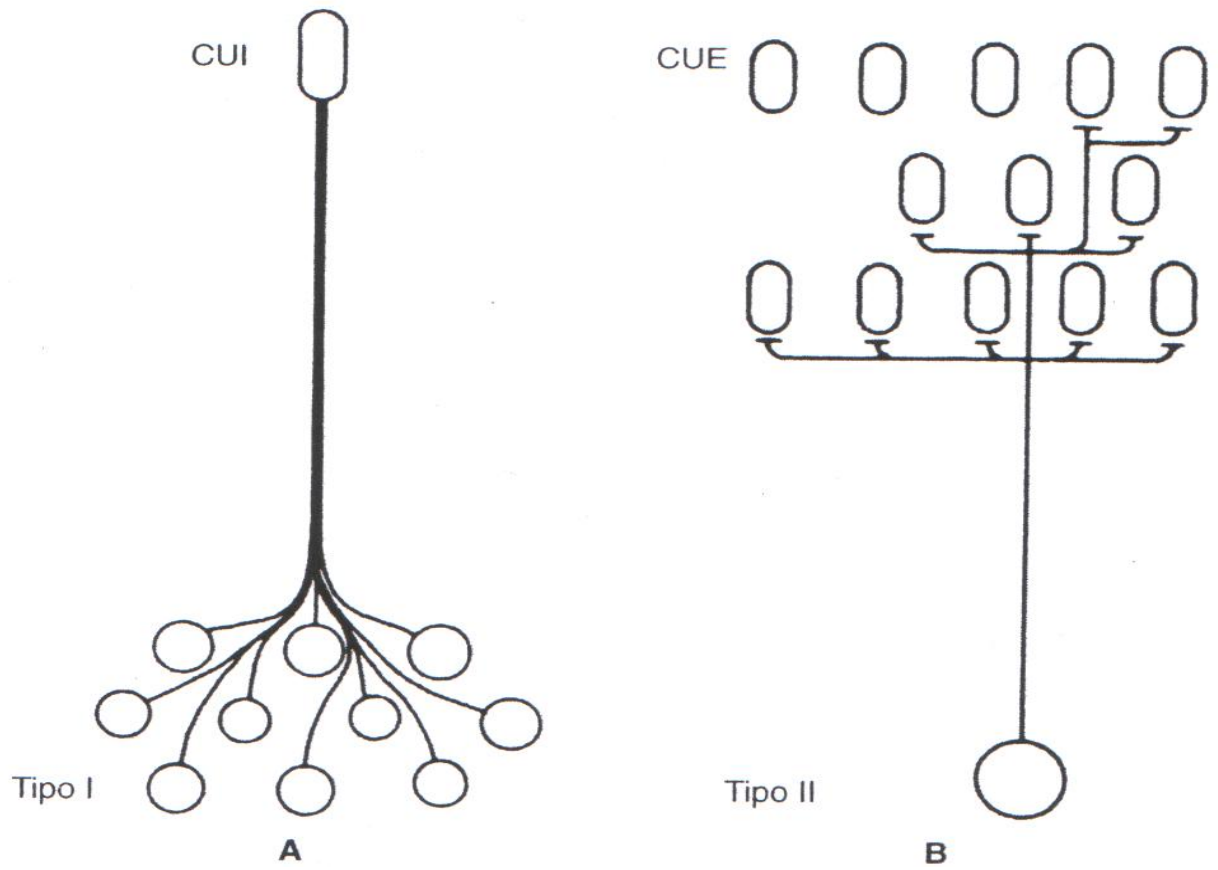


Fig 9. schema sinapsi cellule uditive interne ed esterne. A: neuroni di tipo I, B:neurono di tipo II. CUI: cellule cigliate interne CUE: cellule cigliate esterne(Trevisi and Ricci., 1998)

### ***1.1.3.6 TRASMISSIONE E TRASDUZIONE DEL SUONO***

Le onde sonore prima di essere trasdotte in segnali elettrici subiscono molte modificazioni sia nell'orecchio medio(OM) che nell'orecchio interno (OI). Tali modificazioni si verificano per adattare l'impedenza del segnale, amplificarlo e segregarne le frequenze. (Troiani and Ferraresi, 2005).

Il padiglione auricolare convoglia l'onda sonora verso il meato acustico esterno che termina a livello della membrana del timpano. Queste onde sono in grado di esercitare efficaci pressioni sulla membrana timpanica facendola spostare in avanti e indietro. Queste oscillazioni si ripercuotono a livello della catena ossiculare (martello, incudine e staffa) nell' OM. I tre ossicini amplificano il segnale di 20-30 dB facilitando il passaggio delle onde dal mezzo gassoso al mezzo liquido presente nell' OI. (Troiani and Ferraresi, 2005).

Le onde sonore dall'orecchio medio vengono trasmesse alla coclea grazie all'azione della staffa che colpisce la membrana della finestra ovale. I movimenti alternati della staffa su questa membrana esercitano delle pressioni, che vengono trasmesse al liquido (perilinfia) che riempie la scale timpanica e vestibolare. Le oscillazioni della perilinfia determinano movimenti alternati di tutte le strutture elastiche contenute all' interno della coclea. I movimenti oscillatori che si creano nella scala cocleare, in particolare modo nella membrana basilare, provoca una deformazione dell'Organo del Corti (Troiani and Ferraresi, 2005).

### ***1.1.3.7 DISCRIMINAZIONE DELLE FREQUENZE***

In seguito al movimento della membrana basilare vengono stimulate le cellule cigliate o meglio si ha una variazione della polarizzazione delle cellule interne (IHC) ed esterne (OHC). Le IHCs rappresentano le vere cellule recettoriali, in quanto interagiscono direttamente con i neuroni sensitivi del ganglio spirale che formano il nervo acustico. I neuroni sensitivi convogliano le informazioni acustiche direttamente al sistema nervoso centrale dopo essere state trasformate in stimoli elettrici dall'Organo del Corti (Troiani and Ferraresi, 2005).

Lungo la spirale sia le fibre del ganglio che quelle del nervo acustico sono ordinate proprio in base alla segregazione delle frequenze (tonotopia) poichè ad ogni sezione della coclea corrisponde una determinata frequenza. (Troiani, Ferraresi, 2005).

Dal ganglio spirale il segnale entra nel bulbo e arriva ai nuclei cocleari dorsale e ventrale dove si attua l'analisi della successione temporale degli stimoli e della loro intensità, per poi arrivare al nucleo olivare superiore dove si attua l'analisi delle differenze dell'intensità del suono. Dopodichè il segnale passa dal nucleo del lemnisco laterale al collicolo inferiore e successivamente al talamo. Dal talamo, infine, il segnale viene convogliato alla corteccia uditiva primaria ed alle contigue aree uditive secondarie (Troiani and Ferraresi, 2005).

## 1.2 OTOTOSSICITA'

L'ototossicità si manifesta con danni neurosensoriali. I sintomi da ototossicità possono essere tinnito, vertigine, ipoacusia e iperacusia. Nei casi più gravi l'azione ototossica può portare a marcate perdite dell'udito fino alla sordità completa (Rossi,1997).

Le ipoacusie tossiche possono derivare da intossicazioni endogene o esogene. Un esempio di tossicità endogena si può riscontrare nei pazienti affetti da patologie epatiche dove si genera un'ipoacusia di tipo recettivo spesso accompagnata da vertigini. Tale situazione deriverebbe da una azione tossica diretta alla stria vascolare e ai recettori dell'Organo del Corti. Ad esempio in persone affette da diabete o da accumulo di acido urico si può manifestare una perdita di udito regolare e continua che può generare acufeni (percezione di rumori, suoni fastidiosi e fischi).La tossicità esogena è spesso correlata all'azione ototossica dei farmaci. Esistono molte classi di farmaci che possono generare ototossicità come ad esempio gli antibiotici aminoglicosidici, i salicilati, il chinino, i diuretici (acido etacrinico e furosemide) e i chemioterapici (Rossi,1997).

Tra i chemioterapici che generano ototossicità si ricordano il cisplatino e il carboplatino. Tali farmaci esplicano la loro azione a livello delle cellule cigliate esterne (Smoorburg et al., 1999; Caardinal et al., 2000; Von Ruijuen et al., 2000).

Il danno comincia dalla prima fila di cellule interne del giro basale della coclea per progredire fino alle file delle cellule cigliate esterne (Caardinal et al., 2000). Gli effetti dei complessi del platino si manifestano contemporaneamente nella coclea, nel ganglio spirale e nella stria vascolare (Rossi,1997).

### 1.2.1 CISPLATINO

Il cis-diamminodichloroplatino (cis-(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Cpt) fu sintetizzato la prima volta da Michel Peyrone (Peyrone, 1845), successivamente divenne soggetto di ferventi dibattiti per la sua struttura (Mellor, 1943).

Cinquant'anni più tardi Alfred Werner tramite la teoria della chimica di coordinazione, propose la configurazione del complesso del platino descrivendo le due forme isomeriche *trans* e *cis*. Per questo motivo vinse il premio Nobel nel 1913 (Werner, 1893; Mellor, 1943).

Il cisplatino ha una struttura planare a pianta quadrata con un atomo di Platino (Pt) al centro che coordina quattro leganti, due clori e due ammoniache. Il prefisso “cis” del cis-diamminodichloroplatino si riferisce all'arrangiamento degli atomi di questa molecola intorno all'atomo centrale di Pt: i due atomi di Cl sono disposti su uno stesso lato rispetto all'atomo di Pt e le due molecole di ammoniaca sono disposte esattamente dall'altra parte (Sadler and Zijian., 1998) (Fig.10).

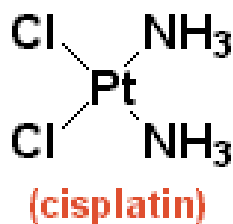
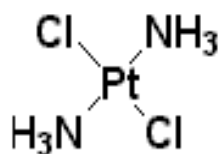


Fig.10: Conformazione del complesso del platino in forma *cis* (<http://dabau.it>)

Se un atomo di Cl si scambia con un molecola di ammoniaca in modo tale da avere su ciascun lato due sostituenti diversi si ottiene la forma “trans” (trans-diamminodichloroplatino) (Fig11).





**trans-diamminedichloroplatinum(II)**

Fig.11 Conformazione del complesso del platino in forma *trans* (<http://dabau.it>)

Dopo circa 120 anni fu scoperta casualmente l'attività biologica del cisplatino dal biofisico Barnett Rosenberg. Per esaminare il ruolo della corrente elettrica nella divisione cellulare fece crescere delle cellule di *Escherichia coli* in una soluzione di cloruro di ammonio ed applicò una corrente tramite elettrodi di platino. Dopo un certo periodo di tempo osservò che le cellule di *E.coli* apparivano allungate e filamentose, dimostrando che era avvenuta un'inibizione della divisione cellulare. In seguito a molte indagini comprese che tale inibizione non era dovuta alla corrente elettrica ma all'azione del platino. Scoprì inoltre che solo la forma *cis* del platino era responsabile dell'inibizione, mentre la forma *trans* era inattiva (Rosemberg, 1965).

Grazie a questi risultati, fu ragionevole pensare che i complessi del platino potessero avere attività anti-neoplastica. Il  $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$  e il  $[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$  furono testati contro il Sarcoma in 180 casi di topi malati di tumore. Entrambe le sostanze dimostrarono di avere una potente azione anti-neoplastica, riducendo le dimensioni dei tumori solidi senza uccidere gli animali. Dopo sei mesi dalle cure i topi non mostravano presenza di cellule tumorali (Rosemberg and Van Camp, 1969-1970). Grazie a questi risultati il cisplatino è diventato uno dei più potenti ed efficaci farmaci anti-neoplastici.

### 1.2.2 MECCANISMO D'AZIONE

Ad oggi è noto che il cisplatino entra nelle cellule passivamente tramite diffusione (Gately, Howell, 1993). Recenti studi hanno suggerito che possa avvenire anche grazie ad un trasporto attivo coniugandosi a proteine che portano ioni di rame bivalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Ishida, Lee, Thiele, Herskowitz, 2002). Il  $\text{Cu}^{2+}$  entra nella cellula in quanto la sua concentrazione all'interno della cellula è relativamente bassa (circa 4-20 nM).

All'interno della cellula l'atomo di cloro si stacca dalla molecola di Cpt e viene sostituito da una molecola di acqua, generando così una specie reattiva che non è in grado di lasciare la cellula, tale complesso è detto monoidratato.

Lavori *in vitro* hanno dimostrato che quando il cisplatino entra nella cellula passa nel nucleo dove si lega al 98% del DNA (Martin, 1999; Arpalahti, 1999; Legendre, Chottard, 1999). L'interazione tra il cisplatino e il DNA avviene perché uno dei gruppi del complesso monoidratato interagisce con una delle basi del DNA (generalmente con la guanina) formando un complesso monofunzionale di DNA. Quando l'atomo di cloro compie una interazione con le basi induce un cambio conformazionale che porta ad un complesso bi funzionale (Jamieson, Lippard 1999; Hambley, 2001). Questi ultimi si formano tra guanina-guanina e tra guanina-adenina, generando una notevole distorsione del DNA (Cohen, Ledner, Bauer, Ushay, Caravana, Lippard, 1980). Tale distorsione può essere riconosciuta da una o più proteine che legano il DNA. come ad esempio la famiglia delle HMG (high-mobility group). Queste proteine si legano al DNA e possono o iniziare la riparazione della doppia elica o attivare il processo apoptotico (Jamieson and Lippard, 1999; Guo and Sadler, 2000; Jelland, 2000; Hambley, 2001; Fuertes et al., 2002).

### ***1.2.3 TOSSICITÀ DEL CISPLATINO***

Il cisplatino è uno degli agenti citotossici maggiormente usati per il trattamento di diversi tipi di tumori solidi come quello al collo, alla testa, ai polmoni, all'ovario, alla vescica e ai testicoli. Sebbene il trattamento con questo farmaco sia estremamente efficace, molto spesso si verificano diversi effetti collaterali come neurotossicità, nefrotossicità e ototossicità. Questi effetti interferiscono con il trattamento e spesso costringono ad una riduzione di dosaggio, frequenza e durata della terapia (Van den Berg, 2006).

L'ototossicità si manifesta con danni al nervo acustico, alla stria vascolare ed alle cellule cigliate esterne (Kopte et al.,1997; Liu et al.,1998; Rybak et al.,1999; Evans and Halliwell,1999; Huang et al.,2000a; Watanabe et al.,2000b; Huang et al.,2000; Alarm et al, 2000; Watanabe et al.,2001; Teranishi et al., 2001; Feghali et al., 2001; Lynch, 2004). Nonostante non sia ancora chiaro il meccanismo attraverso cui il cisplatino espliciti la sua azione, è stato dimostrato che uno dei meccanismi della tossicità è dato dalla genesi delle forme attive dell'ossigeno (ROS) (Rybak et al., 1999) e delle specie reattive dell'azoto (RNS) (Watanabe et al., 2000). È stato verificato che usando alte dosi di questo farmaco si genera una deplezione degli agenti antiossidanti, che servono per proteggere le cellule dallo stress dei ROS e RNS e dall'aumento della perossidazione lipidica all'interno dei tessuti cocleari (Feghali et al., 2001).

Per quanto riguarda la nefrotossicità si sa che si manifesta con l'aumento della resistenza vascolare renale e con danni morfologici degli organuli intracellulari (perdita dei microvilli, cambiamenti del numero e della dimensione dei lisosomi e vacuolizzazione mitocondriale). Il principale bersaglio del Cisplatino a livello del rene è il tubulo prossimale, dove si accumula e promuove danni cellulari (Kawai et al., 2005). Si pensa che

anche in questo caso i danni siano provocati da un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Matsushima et al., 1998) e da una diminuzione degli enzimi antiossidanti (Sadzuka et al., 1992; Weijl et al., 1997;). L'eccessiva generazione dei ROS può distruggere le naturali difese antiossidanti delle cellule renali e portare ad una perossidazione lipidica (LPO) (Vermeulen and Baldeu, 1992). Il cisplatino è anche in grado di aumentare l'attività dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) che porta alla formazione di ossido nitrico (NO), che a sua volta reagisce con l' $O_2$  e porta alla formazione di RNS (Srivastava et al., 1996).

Per affrontare la nefrotossicità prodotta dal Cisplatino in clinica si effettua una forzata diuresi utilizzando soluzione salina ipertonica e agenti diuretici. Mentre per fare fronte all'ototossicità vengono utilizzati vari agenti antiossidanti chemio protettivi come: sodio tiolato, dietiditiolatocarbomate, acido metilbenzoico, D o L-metionina, N-acetilcisteina, estere del glutatione (Ravi and Somani; 1995; Rybak, et al., 1997; Kopke et al. 1999; Wimmer et al. 2004).

### 1.3 APOPTOSI

L'apoptosi è considerata come un “ suicidio cellulare programmato”, perché è un processo di eliminazione delle cellule estremamente regolato e costituisce un pilastro fondamentale per un corretto sviluppo embrionale e per il mantenimento della omeostasi dell'individuo adulto (Rassu., 2003).

Il processo apoptotico può essere suddiviso in quattro fasi: induzione, esecuzione, riconoscimento e fagocitosi. Le diverse fasi si contraddistinguono in quanto generano molteplici cambiamenti morfologici a livello cellulare (Rassu., 2003). In breve: le cellule diventano sferiche e perdono i contatti con le cellule adiacenti; la cromatina comincia a condensarsi in corpi addossati alla membrana nucleare (nucleolemma); il nucleolemma diventa discontinuo e le molecole di DNA vengono frammentate; il nucleo si rompe per formare i corpi cromatinici; infine la membrana plasmatica si rompe e la cellula viene fagocitata oppure può formare dei corpi apoptotici grazie ad un processo chiamato blebbing che vengono fagocitati (Fig12) (Rassu., 2003).

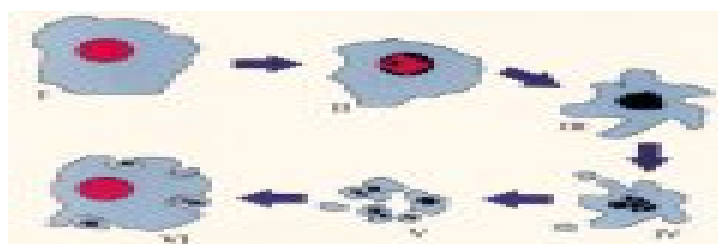


Fig 12 schema dell' apoptosi (www.glaucomaworld.net)

Vista la complessità dell'apoptosi esistono molte proteine che prendono parte alla realizzazione delle vie di trasduzione di tale processo. Tali proteine possono essere divise in attivatori ed inibitori dell'apoptosi. Se si attiva un segnale pro-apoptotico possono bastare poche ore o anche alcuni

giorni per concludersi. Tale differenza può dipendere dalla disponibilità del macchinario molecolare necessario per innescare la morte cellulare (Rassu., 2003).

Oggi si conoscono due vie principali dell'attivazione del segnale apoptotico: la via estrinseca regolata da segnali extracellulari e la via intrinseca controllata da segnali intracellulari. Le due vie non sono esclusive e spesso vengono attivate contemporaneamente. Sia la via estrinseca che quella intrinseca convergono verso l'attivazione dei medesimi enzimi effettori: le caspasi (Rassu., 2003).

### ***1.3.1 CASPASI***

Le caspasi appartengono alla famiglia delle cistein-proteasi citosoliche e tagliano i substrati dopo un residuo di acido aspartico. Sono evolutivamente conservate a partire dal nematode *C.Elegans* fino all' uomo (Mark, Berg, 1999).

Le caspasi, in forma inattiva, si trovano come forme zimogene (o procaspasi), con bassa attività biologica. Queste ultime sono costituite da tre domini: un prodominio N-terminale, un dominio maggiore p20 ed un dominio minore p10 (Hengartner, 2000). La forma attiva delle caspasi è costituita da due eterodimeri p20/p10 legati a dare un tetramero con due siti attivi.

Le caspasi sono classificate in tre gruppi (Böhm and Schild, 2003; Mandic, 2003):

- ✓ ***Caspasi iniziatrici (2, 8, 9, 10)***. Sono le prime caspasi ad essere attivate quando arriva un segnale pro-apoptotico. Questi enzimi tagliano e attivano le caspasi effettrici. Possiedono lunghi segmenti regolatori.
- ✓ ***Caspasi effettrici (3, 6, 7)***. Sono enzimi in grado di tagliare e attivare moltissimi substrati cellulari. Non presentano sequenze regolatrici.

✓ **Caspasi infiammatorie (1, 4, 5, 11, 13).** Non sono enzimi coinvolti nel processo apoptotico. Presentano sequenze regolatrici nel predomino.

Le caspasi iniziatrici giocano un ruolo fondamentale nell' avvio e nella modulazione del processo apoptotico.

Le caspasi effettrici, la cui attivazione viene considerata il punto di non ritorno, ricevono un segnale apoptotico dalle caspasi iniziatrici che ne permettono l'esecuzione biochimica. I bersagli strutturali delle caspasi effettrici possono essere le proteine strutturali (actina, fodrina, gelsolina), della regolazione del ciclo cellulare e della riparazione del DNA e l'inibitore delle CAD (caspase activated DNase).

Le caspasi possono essere attivate mediante diversi meccanismi:

- ✓ **Attivazione tramite tagli proteolitici:** questa attivazione è tipica delle caspasi effettrici. Le caspasi iniziatrici tagliano le pre-forme inattive delle caspasi effettrici, attivandole.
- ✓ **Attivazione mediante contatto:** un esempio di attivazione mediante contatto è la caspasi 8: il "recettore di morte" TNFR interagisce con il suo ligando specifico TNF: l'interazione tra ligando-recettore comporta un cambio conformazionale nella pro-caspasi 8 modificandola in caspasi 8 attiva.
- ✓ **Attivazione per associazione con proteine regolatrici:** ne è un esempio l'attivazione della caspasi 9: la molecola Apaf, possiede un dominio CARD, che riconosce la pro-caspasi 9, attivandola in caspasi 9 (Fig 13).

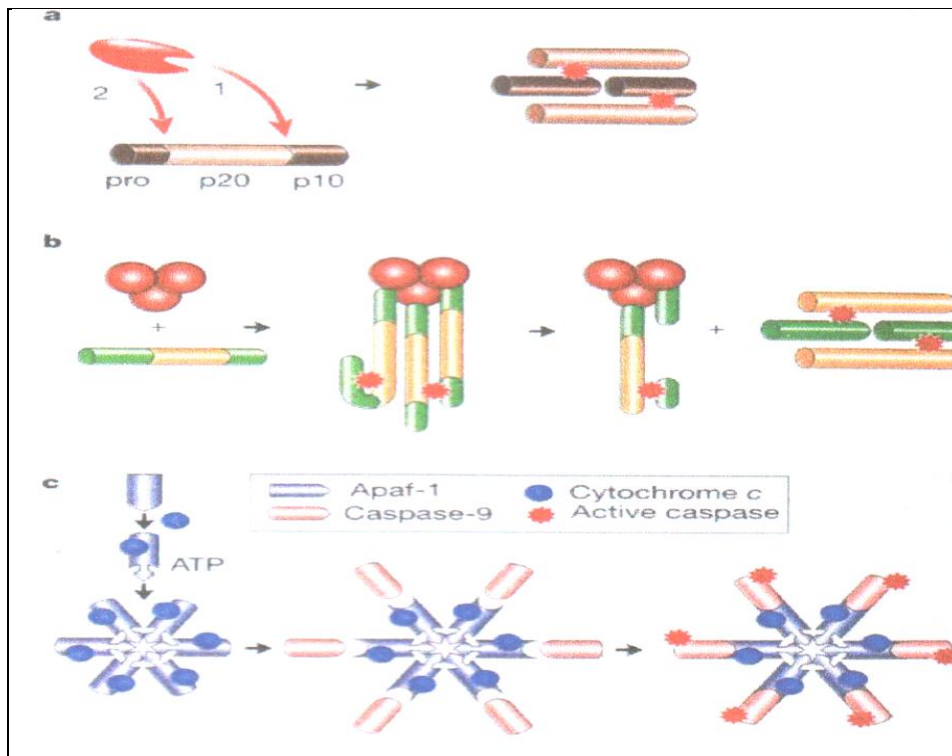


Fig 13. Meccanismo di attivazione delle caspasi. a) Attivazione tramite tagli proteolitici; b) Attivazione mediante contatto; c) Attivazione per associazione con proteine regolatrici (Hengartner, 2000).

### 1.3.2 LE VIE APOPTOTICHE

L'apoptosi può essere attivata da diversi stimoli sia intracellulari che extracellulari (Fig 14), motivo per cui si distinguono due vie, rispettivamente via intrinseca e via estrinseca.

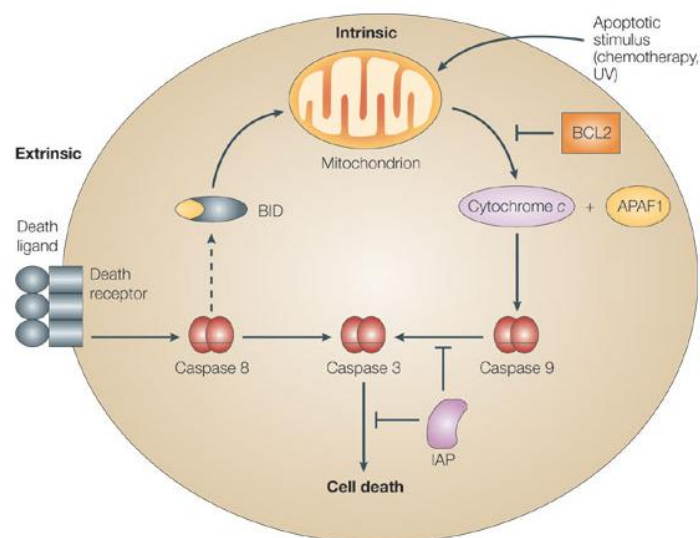




Fig 14 Schema delle via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi ([www.nature.com](http://www.nature.com))

La via intrinseca è basata sul ruolo svolto dai mitocondri e coinvolge la caspasi 9, mentre la via estrinseca richiede la presenza di recettori nella membrana citoplasmatica e coinvolge la caspasi 8 (Hengartner, 2000). Recentemente sono state individuate altre vie di attivazione dell'apoptosi, che coinvolgono il reticolo endoplasmatico, tra cui una via che richiede l'attivazione della caspasi 12, ed un'altra indipendente dalle caspasi (Bin et al., 2010).

### 1.3.3 VIA INTRINSECA

La via intrinseca o mitocondriale viene attivata sia da fattori interni (danni al DNA) sia da fattori esterni (radiazioni, farmaci citotossici). Questi segnali convergono sul mitocondrio, che è un organulo deputato alla produzione di energia e che contiene anche i fattori pro-apoptotici. Questi fattori quando rilasciati dal mitocondrio sono in grado di attivare il processo di morte programmata e sono: Citocromo c, APAF1 (Apoptotic Protease Activator Factor 1), AIF (apoptosis Initiating Factor), SMAC/DIABLO (Second Mitochondrial- derived Activator of Caspase/Direct Iap-Binding protein with low pI).

Il rilascio del Citocromo c nel citosol genera l'assemblamento del complesso proteico chiamato apoptosoma, formato dalla caspasi 9 legata a APAF1 (Li et al, 1997; Zau et al, 1997; Adrain et al, 1999; Rodriguez, Lazebnil, 1999; Cain et al, 2000; Adrain, Martin, 2001). L'attivazione della caspasi 9 a livello dell'apoptosoma comporta la successiva attivazione di altre pro-caspasi effettrici come la caspasi 3 (Srinivasula et al, 1998; Earnshaw et al, 1999; Nicholson, 1999; Slee et al 1999,a, b, 2001, Savic, 2002) (Fig 15)

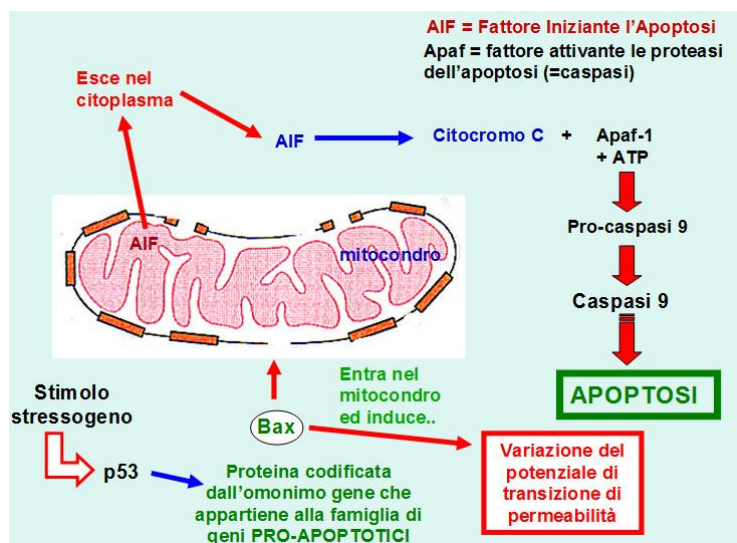


Fig 15 Schema dell' apoptosi per via intrinseca o mitocondriale (www.assie.it)

Viene rilasciato nel citosol per via dell'alterazione della membrana mitocondriale sulla quale si formano dei pori. Si pensa che la formazione di questi sia dovuta all'azione di una serie di proteine appartenenti alla famiglia delle Bcl2. Fanno parte di questa famiglia sia proteine anti-apoptotiche (Bcl2, Bcl-xl) sia proteine pro-apoptotiche (Bax, Bak, Bad, Bid, Bin) (Jiang, Wang 2004).

La Bcl2 è una proteina che inibisce l'apoptosi in quanto blocca il rilascio del Cytocromo c nel citosol. Si pensa che la sua azione sia quella di prevenire la oligomerizzazione di Bax/Bak e la conseguente formazione di pori (Kluck et al, 1997; Yong 1997, Mikhailov et al, 2001), mentre BH-3, che appartiene alla famiglia delle Bcl2 come Bid, induce la omooligomerizzazione delle molecole pro-apoptotiche Bax e/o Bak (Li et al, 1998; Gass et al, 1999; Desouther and Martinow, 2000; Wei et al 2000, Antonsson et al, 2000; Wei, 2001).

Dal mitocondrio vengono rilasciate oltre al Cytocromo c, anche Smac/DIABLO, a causa di segnali pro-apoptotici dovuti all'azione di farmaci citotossici, radiazioni da raggi UV e raggi  $\gamma$ . Questo complesso è presente all'interno del mitocondrio, ma viene codificato da geni nucleari e successivamente trasportato all'interno (Stuart, Neupert, 1990; Du et al, 2000; Verhagen et al, 2000). L'azione di Smac/DIABLO sembrerebbe quella di neutralizzare l'attività delle IAP, che sono inibitori dell'apoptosi (Roy et al, 1997; Deveraux et al, 1998; Due et al, 2000; Verhagen et al, 2000) (Fig 16).

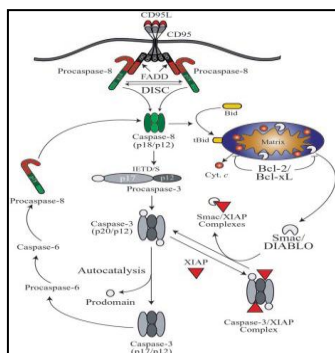


Fig 16 Schema dell'azione di Smac/DIABLO (www.jbc.org)

### 1.3.4 VIA ESTRINSECA

La via estrinseca si verifica grazie all'attivazione di particolari recettori di morte chiamati Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFRs); tra cui vi è il Fas (APO-1) e il TNF-R (tumor necrosis factor - receptor). Questi recettori possiedono diversi domini: il dominio extracellulare (ricco di cisteine), il dominio di trans membrana e il dominio citoplasmatico detto Death Domain (DD).

APO-1 e TNF-R sono recettori che innescano l'apoptosi attraverso il reclutamento della caspasi 8 e tramite l'adattatore FADD.

I meccanismi di attivazione del processo apoptotico da parte di Fas e di TNFR1 sono stati descritti in modo chiaro attraverso approcci biochimici e genetici (Nagata,1997; Ashkenazi, Dixit, 1998; Thornberry, Lazebnik, 1998). Il ligando dei TNFRs genera la trimerizzazione del recettore, che porta al reclutamento di molte proteine adattatrici presenti nel citoplasma (FADD, TRADD). Fas interagisce direttamente con FADD (Fig 17), mentre TNFR interagisce indirettamente con FADD tramite TRADD (Fig 18).

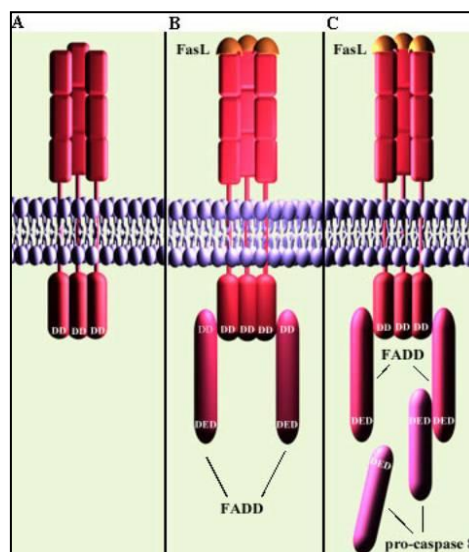


Fig 17 Recettore Fas (www.aber.ac.uk)

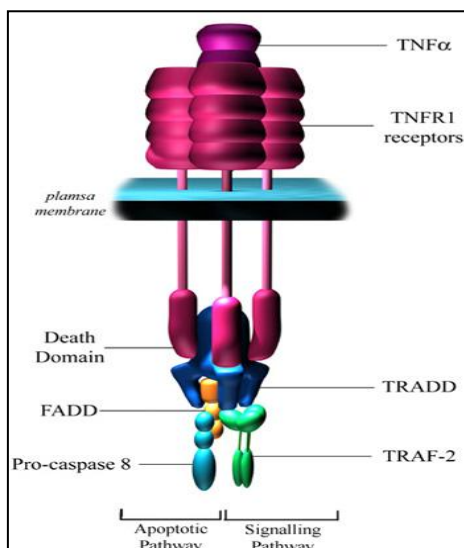


Fig 18 Recettore TNFR (www.sgul.ac.uk)

Le proteine adattatrici quando si legano con il DD formano un complesso chiamato DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Böhm, Schild, 2003, Mandic, 2003). La proteina FADD richiama la forma zimogena della caspasi 8 (pro-caspasi 8) per attivarla (Kischel et al. 2000). La caspasi 8, una volta attivata è in grado di attivare la caspasi 3, che è fondamentale per l'esecuzione dell'apoptosi (Fig 17)

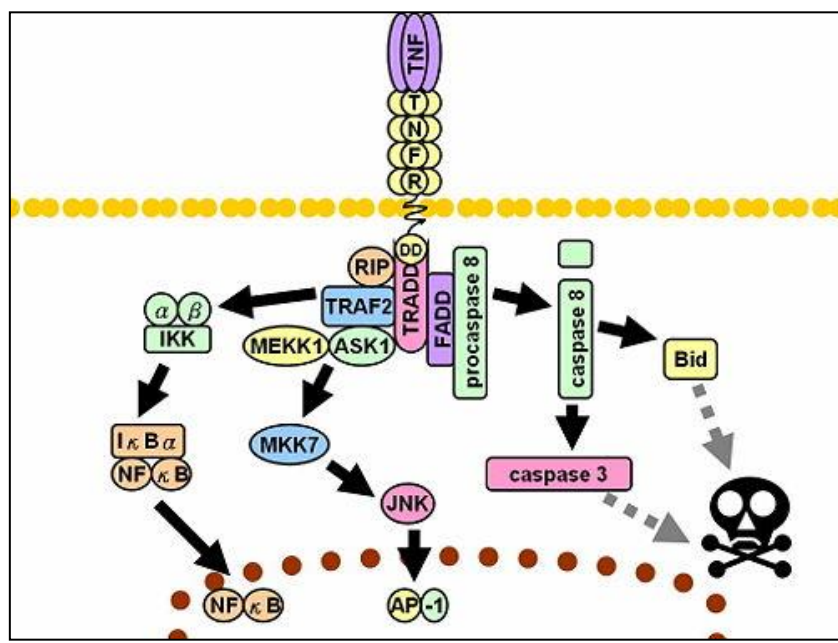


Fig 19 Schema della via estrinseca attraverso l'attivazione della caspasi 8

(www.marshall.edu)

## **1.4 EFFETTO PROTETTIVO DEL DEXAMETASONE DAI DANNI INDOTTI DAL CISPLATINO**

Per contrastare l'ototossicità indotta dal cisplatino sono stati utilizzati diversi tipi di farmaci, tra cui i glucocorticoidi. In questa tesi è stata incentrata l'attenzione su un particolare glucocorticoide: il Dexametasone. Si è voluto comprendere il meccanismo attraverso cui il dexametasone esplichi la sua azione protettiva rispetto all'effetto tossico del Cisplatino.

### ***1.4.1 I GLUCOCORTICOIDI***

I glucocorticoidi sono potenti farmaci antinfiammatori in grado di inibire la sintesi di proteine pro infiammatorie, come le citochine e coenzimi coinvolti nella biosintesi degli eicosanoidi (tra cui le prostaglandine inducibili e le fosfolipasi A<sub>2</sub>) e sono inoltre in grado di attivare la sintesi di proteine antinfiammatorie (Clementi, 1999).

Il più ampio utilizzo clinico dei glucocorticoidi è nel trattamento delle sindromi allergiche come l'asma bronchiale, le malattie infiammatorie dell'occhio, della pelle e dell'artrite reumatoide (Clementi, 1999).

Gli effetti dei glucocorticoidi (GC) sono tessuti specifici e agiscono principalmente grazie all'interazione con i recettori citoplasmatici (Glucocorticoid Receptor, GR) presenti in molte cellule di mammiferi (Ballard et al, 1974; Baxter and Rousseau, 1979).

### 1.4.2 DEXAMETASONE

Il dexametasone è un prodotto di sintesi, è un potente membro della famiglia dei glucocorticoidi e viene impiegato per moltissime terapie (Fig 20).

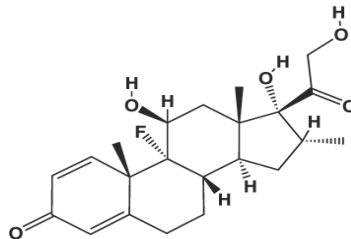


Fig 20: struttura del dexametasone (www.wordpress.com)

La potenza del dexametasone è 20-30 volte superiore a quella dell'ormone naturale idrocortisone ed è 4-5 volte superiore all'azione del prednisone (anch'esso sostanza sintetica).

Viene utilizzato per il trattamento del tumore al seno e disordini linfatici (Smets and Van Den Berg; 1996) e per contrastare la nausea e il vomito indotti dalla chemioterapia (Borjeson et al., 2002). È stato adoperato nelle terapie contro il linfoma sia di Hodgkin's sia non-Hodgkin's e nelle leucemie linfocitarie ( Baetz et al., 2003 , Biagi et al ., 2005), e per la sua capacità angiostatica viene impiegato anche in terapie cardiovascolari (Daniel et al., 1999). Sono riportate molte applicazioni nel trattamento di processi infiammatori acuti e cronici (Tuckermann et al., 2005), nell'edema cerebrale (Jarden et al., 1989) e per imitare l'azione dell'ormone naturale (cortisolo) (Speight, 2000).

Per quanto riguarda patologie dell'orecchio viene applicato nell'orecchio interno per il trattamento di malattie autoimmuni (McCabe,1979; Haynes et al.,1981), nel caso di perdita improvvisa dell'udito (Kanzaki et al ., 1993); e nelle terapie del morbo di Ménière (Shea and Ge, 1996). In fine in recenti

studi è stato dimostrato che il dexametasone ha un effetto protettivo contro l'azione ototossica degli amoniglicosidici (Himeno et al., 2002). Questi dati indicano che i glucocorticoidi, tra cui il dexametasone, possono attenuare la morte cellulare dovuta a fattori di stress. Nelle terapie dell'orecchio interno gli steroidi attualmente sono soprattutto somministrati per via sistemica. Purtroppo questa via di somministrazione è poco efficace in quanto a causa della barriera emato-labirintica (molto simile alla barriera emato-encefalica) è difficile ottenere un'alta concentrazione di steroidi a livello dell'orecchio interno (Parners e t al., 1999). In più è stato dimostrato che la somministrazione sistemica di dexametasone comporta lo sviluppo di effetti collaterali a più organi: danni alle membrane dello stomaco, un aumento del livello di zuccheri nel sangue, disturbi epatici e possibili infezioni. Per aumentare il livello del farmaco nell'orecchio interno ed evitare effetti collaterali ad altri organi, lo si potrebbe somministrare a livello locale. Silverstein e collaboratori (1998) hanno osservato che in pazienti con la sindrome di Ménière si ha un'inibizione degli attacchi di vertigine e una riduzione del tinnito in seguito ad una iniezione di dexametasone nell'area della finestra rotonda. Nel modello animale (Guinea pig) è stata dimostrata l'efficacia della somministrazione locale somministrandolo direttamente nella zona perilinfatica della coclea con una pompa a micro cannula-osmotica (Brown et al., 1993; Prieskorn and Miller, 2000).

Altri studi hanno dimostrato elettrofisiologicamente l'efficacia dell'iniezione intratimpanica del dexametasone come agente protettivo contro l'ototossicità indotta dal cisplatino (Daldal et al 2007). Da uno studio *in vitro* sull'organo coltura dell'ODC il dexametasone sembra essere in grado di generare una over-regolazione dell'attività degli enzimi antiossidanti (Kopke et al, 1997). I risultati ottenuti suggeriscono che l'ormone protegge le cellule dall'azione tossica del cisplatino diminuendo



la distruzione cellulare causata dai radicali liberi. E' stato documentato anche che gli steroidi inibiscono sia l'aumento dell'mRNA-NOS che il rilascio degli intermedi delle specie reattive dell'azoto (Himeno et al., 2002).

### 1.4.3 MECCANISMO D'AZIONE DEL DEXAMETASONE

Il dexametasone entra in forma libera attraverso la membrana e si lega con notevole affinità al suo specifico recettore del glucocorticoide citoplasmatico (GR). Il recettore in assenza dell'ormone risiede nel citoplasma ed è complessato con molte proteine: shock protein 90 (hsp 90), shock protein 70 (hsp 70) e la proteina FKBP 52 che appartiene alla famiglia delle immunofillina (fig.21).

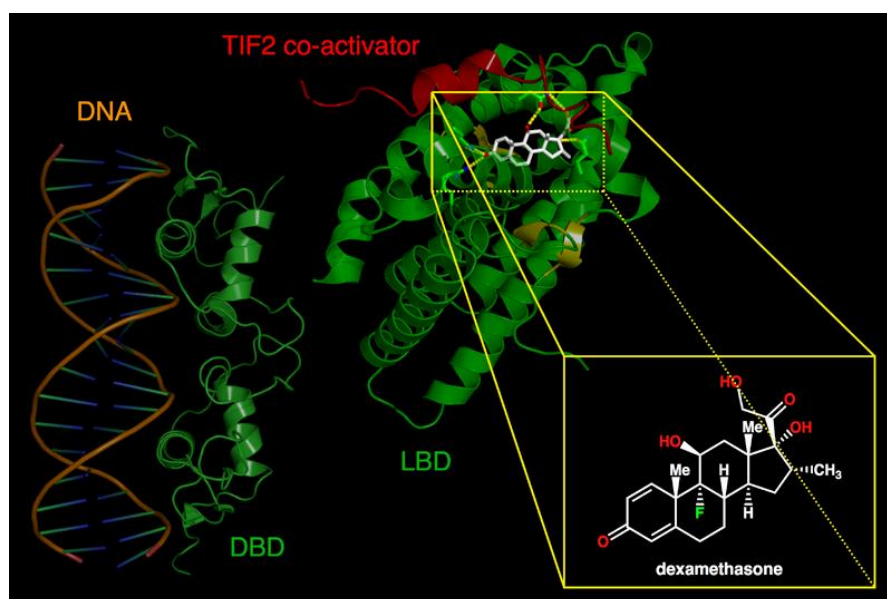
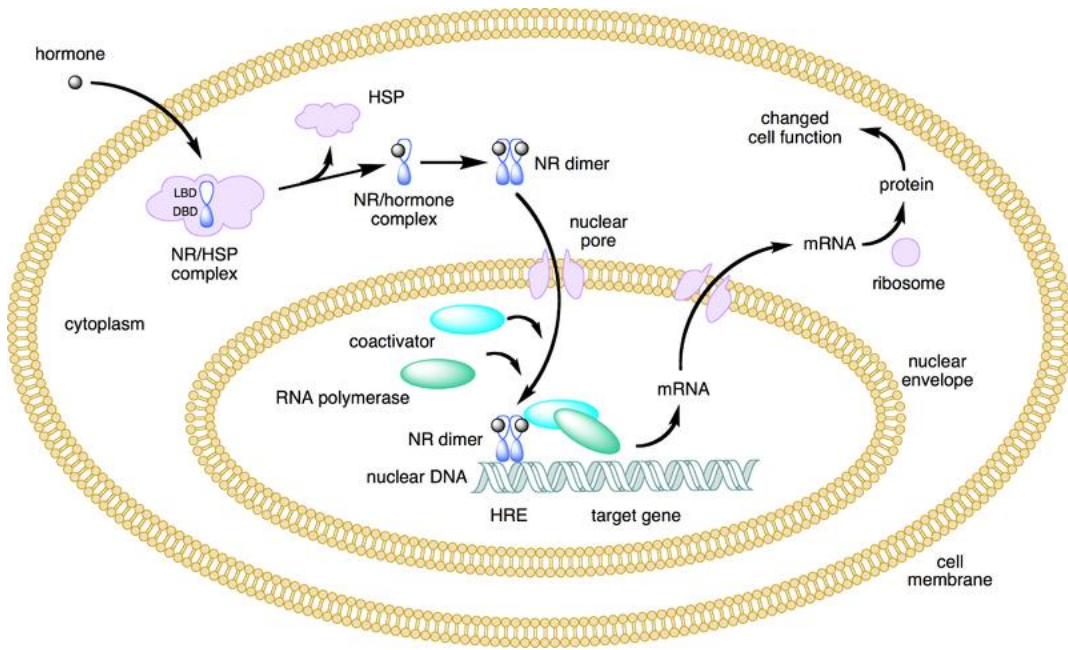


Fig 21: immagine in 3D del recettore del dexametasone (www.wikipedia.org)

Il legame del GR con il glucocorticoide genera un cambiamento conformazionale e la successiva dissociazione con le proteine, che lo rendono inattivo. Il complesso formato dal glucocorticoide e il recettore entra nel nucleo dove interagisce con i “glucocorticoid response elements” (GRE). L’interazione tra il complesso e i GRE comporta un aumento della trascrizione di geni che codificano per le proteine antiinfiammatorie (Fig 22).



;

Fig 22:interazione tra glucocorticoide e recettore citoplasmatico (www.wikideep.it)

## 1.5 MODELLI SPERIMENTALI

In letteratura, per lo studio delle patologie dell'orecchio interno, sono riportati molti lavori che prevedono l'utilizzo sia di modelli sperimentali *in vivo* che *in vitro*.

### 1.5.1 MODELLO SPERIMENTALE IN VIVO

Il modello sperimentale *in vivo* viene impiegato nell'ambito farmacologico, fisiologico, fisiopatologico, biomedico e biologico e si basa sull'utilizzo di piccoli mammiferi come ad esempio i roditori.

Ci si avvale di modelli animali per comprendere i meccanismi fisiologici che si sviluppano durante una patologia, per individuare un trattamento farmacologico specifico e/o trovare possibili modi di prevenzione, per potere infine approfondire ed estendere i risultati all'uomo. Per comprendere i meccanismi basilari vengono utilizzati piccoli roditori presupponendo che la vicinanza evolutiva implichi anche una vicinanza nei meccanismi fisiologici, patologici e molecolari. Ovviamente vi sono dei limiti in quanto nei modelli animali non è possibile riprodurre esattamente il processo patologico umano (Wessler, 1976).

Per quanto riguarda lo studio sulle patologie che coinvolgono l'apparato uditivo i modelli animali che vengono impiegati maggiormente sono ceppi derivanti da ratti (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), topi (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) e da Guinea pigs (*Cavia porcellus* Pallas, 1776).

Il modello murino (topo) è ottimale per studiare le basi genetiche delle patologie uditive come la sordità ereditaria non sindromica (DFNA, DNFB), la sindrome di Aliport, la sindrome di Pendred, la sindrome si

Usher. Esistono infatti molte similitudini tra il genoma di topo e il genoma umano e a livello dell'apparato uditivo è notevole la somiglianza fisiologica e morfologica tra le due specie.

Per studiare gli effetti del rumore il modello sperimentale più opportuno è rappresentato dal ratto. Diversi studi sono stati incentrati nel comprendere gli eventi molecolari che portano alla perdita delle cellule cigliate e dunque alla permanente sordità dovuta all'esposizione a suono assordante (Younsook , 2004). Il ratto è considerato anche un buon modello per comprendere l'effetto ototossico di alcuni farmaci come il Cisplatino e gli aminoglicosidi (Pierson and Møller, 1981; Otto, 1998).

Per applicazioni chirurgiche il modello più idoneo è la *Cavia* in quanto presenta un' orecchio medio più grande rispetto gli altri roditori. Questo particolare facilita l'accesso degli strumenti chirurgici attraverso le vie retro-auricolare, sottomascellare e intratimpanica. L'accesso al meato acustico è largo infatti si può accedere senza l'uso dell'otoscopio ed è molto semplice localizzare la membrana timpanica. Un ulteriore motivo è dato dal fatto che i Guinea pigs nascono con il sistema nervoso centrale (SNC) completamente formato e completamente funzionante, per tale motivo possono essere utilizzati per studi audiologici (Arch-Tirado and Verduzco-Mendoza, 2005).

### ***1.5.2 UTILIZZO DI COLTURE CELLULARI PER LO STUDIO DELLA OTOTOSSICITA' E DELLA PROTEZIONE IN VITRO***

In letteratura vi sono più modelli cellulari utilizzati per lo studio della tossicità di sostanze dannose per l'orecchio interno. Si utilizzano sia linee immortalizzate che colture primarie. Fra le linee immortalizzate sono note le PC12 che derivano da feocromocitoma di ratto e sono in grado di differenziare in neuroni, vi sono inoltre alcune linee cellulari derivanti dall'orecchio interno quali le OC-k1 /2 /3 /4 e le Hei-OC 1 che sono state isolate e modificate dal gruppo del dr Kalinec (1999, 2003).

Oltre a queste negli ultimi anni in letteratura sono state riportate anche linee cellulari staminali isolate dalla capsula otica di topo e umane (ad esempio le human Fetal Auditory Stem Cells, hFASC)(Sakamoto 2004; Hildebrand, 2005; Hu, 2005; Coleman, 2006; Rivolta e Holley, 2008).

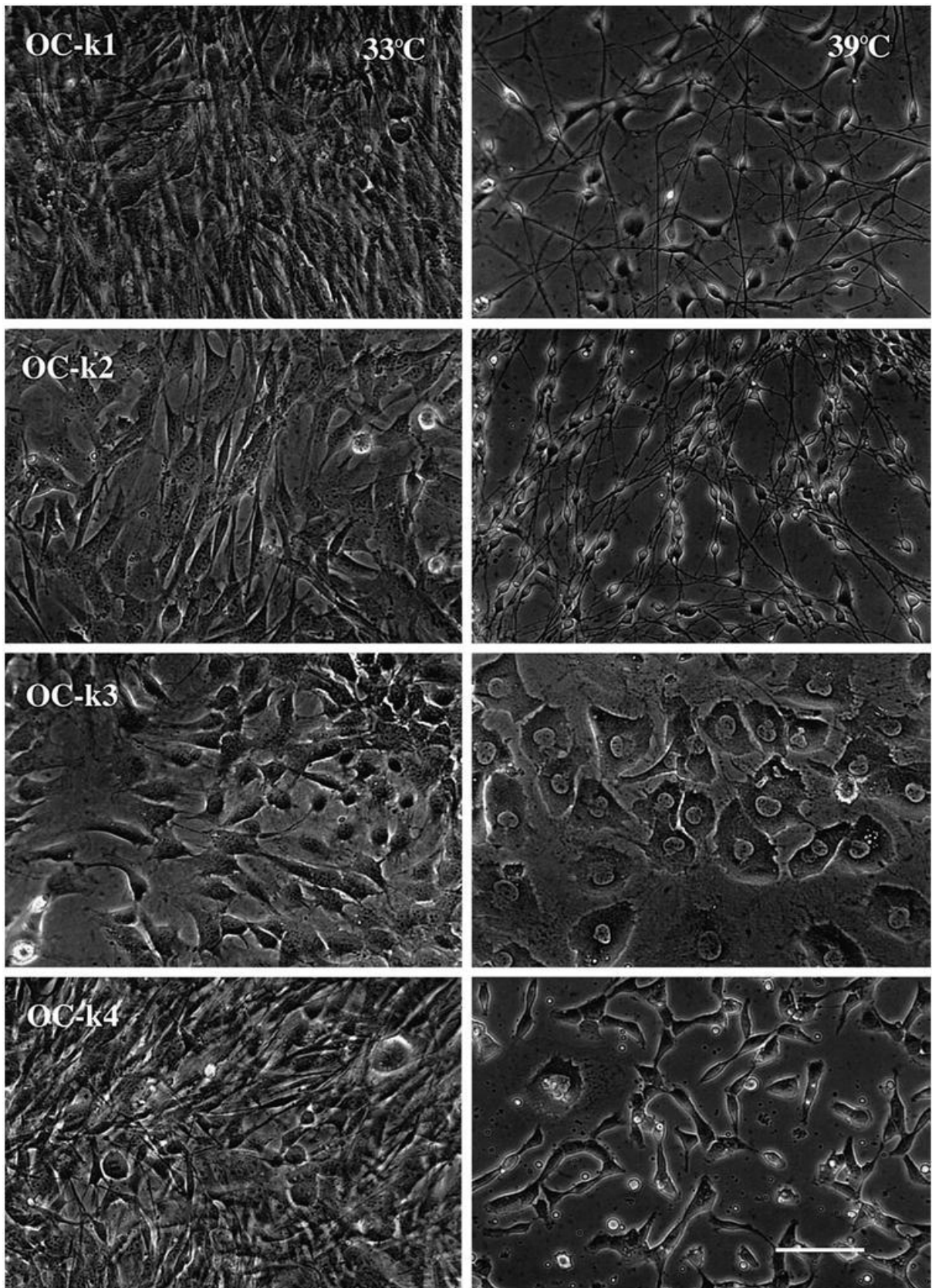
### **1.5.3 MODELLO CELLULARE IN VITRO OC-K3**

Kalinec e il suo gruppo di lavoro hanno isolato le cellule dell'Organo del Corti di topo transgenico ( H-2Kb-ts A 58) di due settimane. Queste sono poi state modificate immortalizzate inserendovi il gene virale delle SV 40 (simian virus 40), che codifica per la proteina antigenica T grande termolabile (TAG protein).

La proteina TAG è attiva quando le cellule sono a 33 °C e quando nel terreno di coltura è presente l'interferone  $\gamma$ . A questa temperatura le cellule sono principalmente piccole, rotonde o fusiformi e proliferano rapidamente. Queste sono condizioni di crescita permissive e le cellule anche dopo 50 passaggi non presentano cambiamenti nell'espressione proteica (fig. 23, colonna di sinistra). Quando la temperatura viene portata a 39 °C e dal terreno di coltura viene eliminato l'interferone  $\gamma$ , la proteina TAG viene denaturata e inattivata (Ikram et al., 1994; Gono set al., 1996). Queste sono le condizioni non permissive e le cellule a queste condizioni smettono di proliferare, cambia il loro aspetto morfologico e il loro comportamento nell'espressione proteica (Kalinec et al., 1999) (Fig 26, colonna di destra).

I cloni isolati sono stati chiamati OC-k1, OC-k2, OC-k3, OC-k4 e sono tutti risultati positivi al marker neuroepiteliale nestina e per il marker tipico dell'orecchio interno OCP2.

Queste cellule mostrano una certa reattività ai marker epiteliali e neuronali, ma con un modello di espressione proteica diverso per ogni clone e per stato di differenziamento (a 33 °C o a 39 °C).



**Figura 26:** immagini dei cloni OC-k1, OC-k2, OC-k3, OC-k4 al microscopio a contrasto di fase. Nella colonna di sx vi sono immagini delle cellule cresciute in condizioni permissive: 33°C). Nella colonna di dx vi sono immagini delle cellule cresciute in condizioni non permissive: 39°C) (Kalinec et al., 1999).



Le OC-k3 a 39 °C si presentano come cellule larghe, piatte come le cellule epiteliali e disposte a monostrato. Esse esprimono la proteina ZO-1 associata alle tight junction che si manifesta con l'immunofluorescenza nell'area cellula-cellula tra le cellule adiacenti (Fig 27)

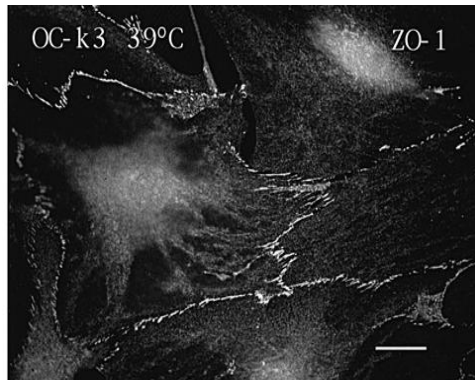


Fig 27 .immagine della fluorescenza espressa dalla proteina ZO-1 nelle tight-junction (con l'anticorpo anti-ZO-1). (Kalinec et al., 1999).

Le OC-k3 sono l'unica linea con caratteristiche epiteliali ben definite. Esse esprimono simultaneamente dei marker tipici delle cellule sensoriali uditive (come la miosina VII A e il recettore  $\alpha$ -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* in quanto mimano le cellule cigliate dell'ODC. In più le OC-k3 sono state utilizzate per studi sulla otossicità per valutare i meccanismi di due farmaci quali la gentamicina e il cisplatino (Bertolaso et al., 2001, 2003; Previati et al., 2004, 2007).

#### ***1.5.4 MODELLO SPERIMENTALE IN VITRO HUMAN FETAL AUDITORY STEM CELLS (hFASC)***

In studi recenti si è visto che la coclea umana in fase fetale può essere usata come fonte di cellule uditive per generare colture che contengono cellule staminali e/o progenitori cellulari. Per tale motivo il gruppo del Dr. Rivolta ha isolato e caratterizzato cellule estratte dalla coclea fetale umana. Le Human Fetal Auditory Stem Cells (hFASC) possono essere espanse per lunghi periodi e differenziate in neuroni bipolari e in cellule simili alle cellule cigliate. Una volta differenziate mostrano le stesse proprietà funzionali ed elettrofisiologiche che presentano durante lo sviluppo i corrispettivi tessuti cocleari *in vivo* (Chen et al., 2009).

Le hFASC, dunque, potrebbero essere usate per studiare i processi dello sviluppo dei neuroni e delle cellule cigliate nella coclea umana e fungere da modello per valutare *in vitro* la tossicità farmacologica e per facilitare lo sviluppo di terapie geniche utili a contrastare la perdita di udito.

##### ***1.5.4.1 PRELIEVO E CONSERVAZIONE DELLE HUMAN FETAL STEM CELLS (hFASC)***

La raccolta dei tessuti fetali umani è stata fatta in accordo con le linee guida Polkinhorne e con l'approvazione e il consenso informato.

Le coclee sono state rimosse dal feto tra la nona e la dodicesima settimana di gestazione utilizzando una soluzione sterile (soluzione Hanks). La capsula cartilaginea è stata rimossa e l'epitelio cocleare è stato gentilmente dissezionato dal tessuto circostante ed espantato come una piccolissima parte di tessuto.

Il tessuto così ottenuto viene dissociato utilizzando una soluzione Hanks contenente la trypsin, in modo tale da ottenere singole cellule dalle coclee

fetali. Le cellule in seguito sono state mantenute in terreno di coltura ricco di glucosio e siero a 37°C.

#### ***1.5.4.2. HUMAN FETAL AUDITORY STEM CELLS (hFASC) POSSONO ESSERE DIFFERENZIATE IN NEURONI E IN CELLULE CIGLIATE***

L'espansione *in vitro* delle hFASC serve per analizzare la loro capacità di differenziare in cellule simili alle cellule cigliate e in neuroni bipolari.

Per la differenziazione in neuroni bipolari è necessario che le cellule vengono dissociate con la trypsin e coltivate con particolari fattori nutritivi e fattori di crescita (bFGF, N<sub>2</sub>, F12, B27, Shh, IGF, Neurotrofina 3, BDNF). È stato verificato la loro natura bipolare valutando l'espressione delle correnti del sodio I<sub>Na</sub> e del potassio I<sub>KI</sub> e del calcio I<sub>CA</sub>.

Per la differenziazione in cellule simili alle cellule cigliate è necessario dissociarle con una soluzione chiamata "enzyme free cell dissociation solution" e coltivarle con un terreno contenente particolari fattori nutritivi e fattori di crescita (N<sub>2</sub>, F12, B27, acido retinoico e EGF). Queste cellule mostrano sia marker molecolari sia caratteristiche elettrofisiologiche tipici delle cellule cigliate. Sebbene non mostrino la tipica formazione del fascio di ciglia hanno una graduale corrente I<sub>Na</sub> e I<sub>KI</sub> che indica una progressiva differenziazione *in vitro*.

Le hFASC una volta differenziate possono essere mantenute *in vitro* per oltre un anno.

## 1.6 TERAPIA GENICA

Le cellule staminali possono essere indotte a differenziare in diversi tipi cellulari sia aggiungendo al terreno di coltura particolari fattori di crescita sia attraverso manipolazioni genetiche.

Queste manipolazioni, che consistono nell'inserire un gene o un frammento di gene per prevenire, trattare o curare una malattia, prendono il nome di terapia genica.

Per veicolare il DNA all'interno delle cellule vi sono diversi metodi, ad esempio introducendo il DNA nudo coniugato con fosfato di calcio o dietilaminoetil-destrano (DEAE-destrano) alle cellule in coltura. Esistono però anche metodi di tipo fisico come la microiniezione e l'elettroporazione. Infine vi sono metodi di trasfezione stabile, ovvero che prevedono l'inserimento di frammenti di DNA all'interno del genoma ospite, basati sull'attività biologica di vettori virali e non virali (trasposoni).

Si utilizzano i vettori virali perché si sfrutta la loro capacità naturale di entrare nelle cellule e di introdursi nel genoma delle cellule ospiti. Tuttavia molti studi hanno determinato che non tutti i virus sono adatti al trasporto di materiale genetico. I virus utilizzati per il trasporto di DNA sono gli adenovirus, gli herpes virus, i retrovirus e gli adenovirus associati (AVV). Nonostante i virus abbiano un'efficacia di trasfezione molto alta (Dobbestein., 2003; Thomas, 2003) non sono ritenuti molto sicuri, in quanto l'inserzione cromosomiale di un gene endogeno può generare una mutagenesi (Check, 2002), oppure attivare una indesiderata risposta immunologica con anche gravi conseguenze (Thomas, 2003).

Onde evitare tali problemi si possono utilizzare per il trasporto di materiale genetico i vettori non virali o trasposoni, che prevedono di veicolare il

DNA nudo complessato con liposomi, con polipeptidi o con polimeri sintetici. Questi sono molto più sicuri dei virus anche se la loro efficienza risulta minore rispetto ai vettori virali (Abdallah, 1995; Herweijer, 2003; Niidome, 2002).

### ***1.6.1 I TRASPOSONI***

I trasposoni sono discreti segmenti di DNA capaci di muoversi all'interno del genoma delle cellule ospiti, sono elementi naturali, non di origine virale e possono essere considerato come veicoli di DNA.

Gli elementi trasponibili sono stati utilizzati come veicoli di geni in varie specie di invertebrati, sia per mutagenesi inserzionale sia per l'inserzione di geni nella via germinativa. Sia negli insetti che nei vermi nematodi sono stati trovati elementi trasponibili endogeni attivi che poi sono stati utilizzati su loro stessi, tra questi sono noti l'elemento P della *Drosophila* e il Tc1 del *Caenorhabditis elegans* (Cooley, 1988; Plasterk, 1996).

Sfortunatamente fino ad oggi nei vertebrati non sono stati trovati elementi trasponibili attivi, ciò è dovuto al fatto che sono diventati silenti durante l'evoluzione (Ivics, 1996). Per ovviare questo problema nei vertebrati vengono utilizzati degli elementi trasponibili derivanti dagli invertebrati, oppure vengono ricostruite le sequenze consenso attive di trasposoni "morti", tra questi si ricorda l'elemento *Sleeping Beauty* (SB) appartenente alla famiglia dei TC1/mariner trovato nel genoma di pesce (Ivics, 1997).

SB mostra una maggiore attività nei vertebrati rispetto qualsiasi altro elemento trasponibile testato (Fisher, 2001). La "ricostruzione" di SB ha generato un notevole interesse nello sviluppare nuove, sicure, semplici ed efficienti tecnologie per la terapia genica da applicare sull'uomo.

L'elemento trasponibile SB ha una struttura molto semplice, che consiste in un singolo gene che codifica per la trasposasi fiancheggiato da due

sequenze ripetute in senso invertito (IRs), che sono i siti che vengono riconosciuti dalla trasposasi (Plasterk, 1999) (Fig 23)

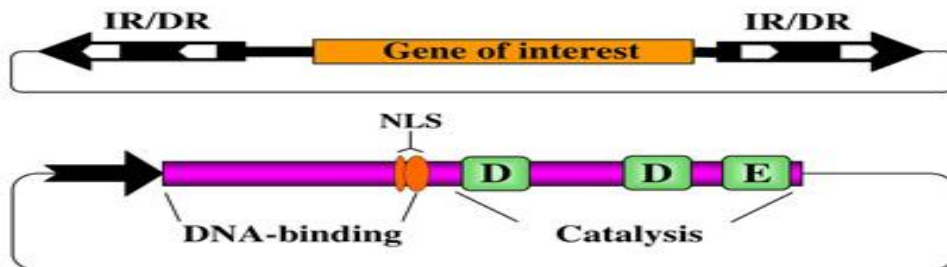


Fig 23 rappresentazione dell'elemento trasponibile SB presa dal sito

Immagine trattata dal sito [www.mdc-berlin.de/en/research\\_teams](http://www.mdc-berlin.de/en/research_teams)

La trasposizione di SB avviene tramite un processo taglia-cuci, durante il quale l'elemento trasponibile viene exciso dalla sua localizzazione originale dalla trasposasi in una nuova localizzazione (Doak, 1994, Van Luenen 1994, Katzman, 1995, Ivics, 1997; Junop, 1997, Plasterk, 1999, Izvák, 2000, Fischer, 2001; Dupuy, 2002; Izvák, 2002; Mikkelsen, 2003) (Fig 24).

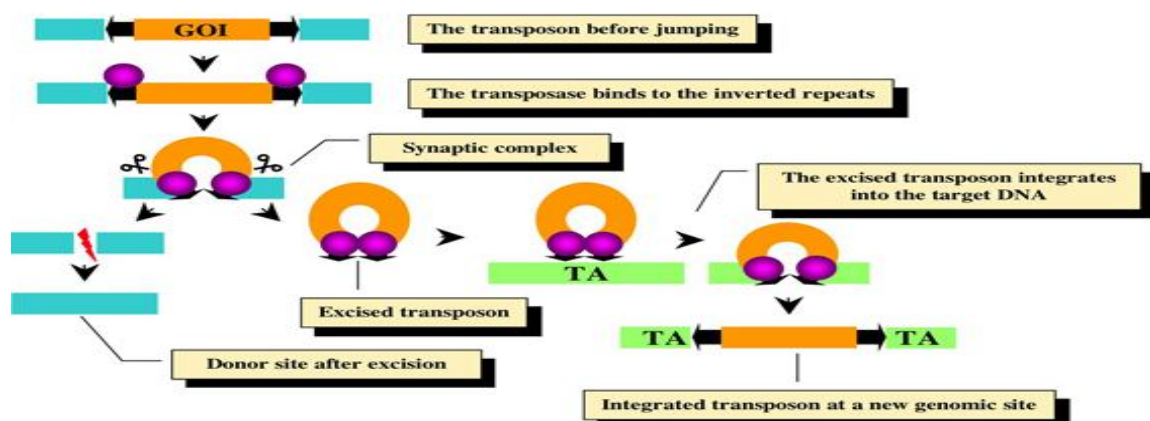


Fig 24 Rappresentazione del processo tagli e cucì di SB

Immagine trattata dal sito [www.mdc-berlin.de/en/research\\_teams](http://www.mdc-berlin.de/en/research_teams)

Il processo di trasposizione può essere diviso in quattro principali step:

1. Riconoscimento da parte della trasposasi delle sequenze ripetute in senso invertito.
2. Formazione del complesso nel quale le IRs vengono appaiate e tenute insieme dalle sub unità della trasposasi.
3. Excisione dal sito di origine.
4. Integrazione del trasposone in un nuovo sito bersaglio.

Il sistema di trasfezione sfrutta questo processo di integrazione taglia e cuci scomponendo l'elemento trasponibile in due vettori (Fig 25). Il gene per la trasposasi viene fisicamente separato dalle IRs e rimpiazzato con un altro frammento di DNA. Il gene per la trasposasi può essere localizzato nella stessa molecola di DNA come trasposone (Mikkelsen, 2003), o situato in un'altra molecola di DNA (Izváková, 2000) o fornito sotto forma di mRNA (Dupuy, 2002) o di proteina.

Molti studi sono stati effettuati utilizzando SB per verificare la sua capacità di generare una espressione genica a lungo termine. Il gruppo del Dr. Belur, ad esempio, ha trattato topi iniettando SB coniugato con pT/Luciferasi nei polmoni e ha notato che anche dopo tre mesi le cellule erano ancora capaci di esprimere tale gene (Belur et al., 2003).

Si può affermare che il sistema di trasfezione basato sull'elemento trasponibile SB è in grado di generare una espressione genica a lungo termine e che quindi può essere adottato per future applicazioni di terapia genica. Lo SB infatti combina i vantaggi dei vettori virali, in quanto dirige l'integrazione di singole copie del gene per la terapia, con i vantaggi dei vettori non virali per via dell'assenza di fattori proteici che possono suscitare reazioni avverse.

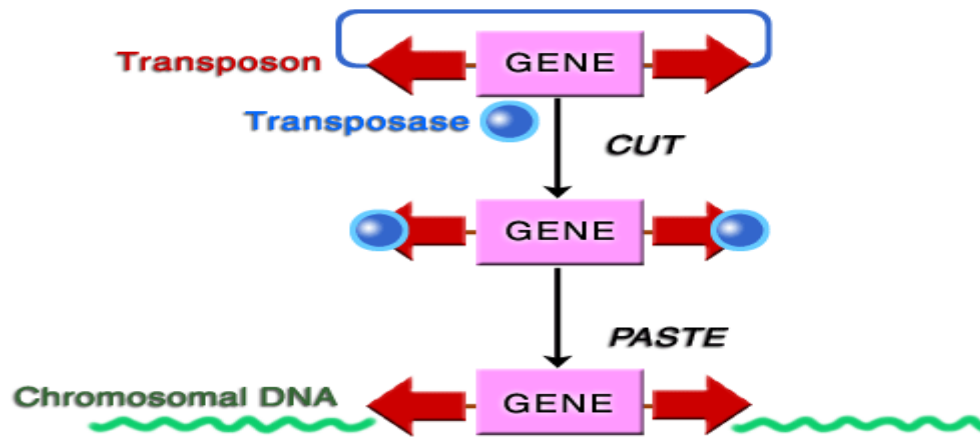


Fig 25 rappresentazione del sistema di trasfezione basato sull'elemento trasponibile SB presa dal sito [www.discoverygenomics.net/sbts.html](http://www.discoverygenomics.net/sbts.html)



## 1.7 SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questa tesi è studiare l'azione e i meccanismi attraverso cui un antiinfiammatorio come il dexametasone possa proteggere le strutture dell'orecchio interno dall'azione tossica da parte del cisplatino e verificare la possibile applicazione di un vettore non virale, quale lo *Sleeping beauty* (SB), per modificare cellule staminali dell'orecchio interno utili per la rigenerazione del tessuto neurosensoriale.

È interessante studiare farmaci in grado di contrastare la tossicità del cisplatino perché è noto che tra gli effetti collaterali più frequenti genera ototossicità. L'azione tossica a livello del sistema uditivo si verifica a livello dell'Organo del Corti, della stria vascolare e del ganglio spirale. I danni a queste strutture comporta la morte per apoptosi. Queste strutture, però, non sono in grado di rigenerarsi e perciò una volta indotte in apoptosi non possono essere sostituite. Si è deciso di utilizzare il dexametasone in quanto è un glucocorticoide, che generalmente viene usato per combattere processi infiammatori e per contrastare la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Gli esperimenti svolti in questa tesi sono stati quindi condotti utilizzando come modello sperimentale *in vitro* la linea cellulare OC-k3 e come modello sperimentale *in vivo* i ratti Wistar. Per verificare gli effetti tossici dei farmaci è stata valutata l'espressione dei pathways apoptotici, utilizzando varie metodologie come il citofluorimetro a flusso, l'immunocitochimica, l'immunoistochimica, la microscopia elettronica a scansione.

Per applicazioni di terapia genica sono state utilizzate le human Fetal Auditory Stem Cell (hFASC). Lo è stato incentrato sullo sviluppo dell'applicazione di un metodo non virale di terapia genica basato sull'elemento trasponibile SB. Dopo aver valutato il grado di tolleranza da parte delle hFASC dei vettori non virali, si è deciso di verificare

l'interazione dell'integrazione del DNA esogeno con i meccanismi alla base del differenziamento sia in neuroni bipolari sia in cellule cigliate delle cellule in esame. Tutto questo è stato eseguito per riuscire a generare un protocollo per una futura terapia genica utile a combattere la sordità.

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 L'EFFETTO PROTETTIVO *IN VITRO* DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO**

Le OC-k3 sono state trattate con due diversi farmaci il Dexametasone 2-NaP (Sigma-Aldrich, Italy) e il Cisplatino Mayne (Pharma, Italy) aggiunte direttamente al terreno di coltura.

Si sa che il Cisplatino è un agente citotossico e che è in grado di danneggiare moltissimi tessuti tra cui l' apparato uditivo. Si è deciso di utilizzare il Dexametasone, in quanto è una sostanza in grado di proteggere i tessuti dall' azione tossica del Cisplatino. Per determinare la tossicità delle due sostanze e la protezione da parte del Dexametasone si è deciso di utilizzare differenti concentrazioni e differenti tempi di incubazione, in base ai test effettuati.

In tutti gli esperimenti e in tutti i test effettuati il Dexametasone è stato somministrato 24 h prima rispetto al Cisplatino.

Le tecniche utilizzate per valutare la tossicità e la protezione sono:

- ✓ Test di Tossicità: Ciflurimetria a flusso
- ✓ Studio morfologico del citoscheletro e condensazione della cromatina: FALLOIDINA-DAPI
- ✓ Studio dell' espressione dei marker apoptotici tramite immunocitochimica

In tutte le prove effettuate sono stati preparati dei campioni non trattati come controllo negativo. Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno quattro volte ed ogni volta i campioni sono stati preparati e trattati in doppio.

### **2.1.1 MODELLO CELLULARE OC-k3**

Le OC-k3 sono cellule mantenute in adesione in condizioni permissive a 33°C con una percentuale di CO<sub>2</sub> pari al 10%.

Il terreno di coltura per queste cellule è costituito da:

- ✓ DMEM (Bulbecco Modified Eagle's Medium; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)
- ✓ FBS 10% (Fetal Bovine Serum; Gibco BRL)
- ✓ L-Glutammina 1% (Gibco BRL)
- ✓ Interferone  $\gamma$  50U/ml (IFN, Genzyme, Cambridge, MA, USA)

Il terreno di coltura viene cambiato ogni due giorni e quando a confluenza le cellule vengono staccate con la Trypsina EDTA 0.25% (Gibco BRL) a temperatura ambiente per 1 minuto.

### **2.1.2 TEST DI TOSSICITA' E PROTEZIONE SULLE OC-k3 MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO**

Per testare gli effetti tossici del Dexametasone e del Cisplatino si è deciso di eseguire il Test di Tossicità mediante la citofluorimetria a flusso (FACS-Calibur, Becton Dickinson). Per effettuare Test di Tossicità sono state utilizzate differenti concentrazioni di Dexametasone e di Cisplatino:

- ✓ Dexametasone: 50 nM, 100 nM, 250 nM
- ✓ Cisplatino: 13  $\mu$ M, 25  $\mu$ M

Le due sostanze sono state testate a differenti tempi di incubazioni:

- ✓ 24h
- ✓ 48h
- ✓ 72h

Dopo aver effettuato la tossicità delle due sostanze si sono eseguite le prove di protezione (Test di protezione), che consistono nel pretrattare le cellule con il Dexametasone 24h prima rispetto al Cisplatino.

Il parametro utilizzato sia per il Test di Tossicità sia per il Test di protezione è la vitalità cellulare.

Il citofluorimetro a flusso è uno strumento che permette di svolgere indagini sulla vitalità e sulla mortalità cellulare esaminando 10000 eventi in pochi minuti. I campioni sono stati preparati seminando circa 150000 cellule/pozzetto nelle piastre 6 wells. Il giorno successivo dopo aver cambiato il terreno di coltura si comincia il trattamento con il Dexametasone. Dopo 24 h le cellule vengono trattate con il Cisplatino. Per ogni esperimento sono stati preparati anche dei campioni non trattati che sono stati utilizzati come controlli negativi.

Al termine dei tempi di incubazione il terreno di coltura viene prelevato e messo in tubi specifici per la citofluorimetria dopodiché le cellule vengono staccate con Tripsina EDTA ( 1min. T.A). L'azione disagregante della tripsina viene inattivata dal terreno che precedentemente era stato raccolto. Le cellule con il terreno di coltura e la tripsina vengono raccolte e mantenute in ghiaccio.

A tutti i campioni viene aggiunto lo ioduro di propidio (PI, SIGMA) alla concentrazione finale di 2µg/ml e mantenuti al buio per 10 minuti. I parametri presi in considerazione sono la complessità e la dimensione delle cellule (side scatter/forward scatter: SSC/FSC) e la fluorescenza emessa dalle cellule marcate con il PI (FL2-H).

Il PI è un intercalante del DNA, le cellule vive non lo inglobano in quanto presentano delle pompe sulla membrana in grado di espellerlo; le cellule morte o danneggiate, invece, non sono in grado di eliminare il Piche entra

nei nuclei e li marca, per questo motivo si è in grado di distinguere le cellule morte dalle cellule vive.

Per ogni campione sono state calcolate la percentuale di cellule vive e di cellule morte con il programma Cell Quest Pro (Becton Dickinson), dopodiché i dati sono stati sottoposti ad analisi statistiche e la mortalità è stata riportata in grafici.

### **2.1.3 STUDIO MORFOLOGICO DEL CITOSCHELETRO E DELLA CONDENSAZIONE DELLA CROMATINA**

Attraverso questo studio morfologico si è voluto indagare lo stato del citoscheletro e del nucleo per valutare se il Dexametasone e il Cisplatino possono aver causato alterazioni alle cellule.

Le concentrazioni testate sono:

- ✓ Dexametasone: 50nM, 100nM, 250nM
- ✓ Cisplatino: 13 $\mu$ M, 25  $\mu$ M

I tempi di incubazione analizzati sono:

- ✓ 24h
- ✓ 48h

Le OC-k3 sono state seminate su vetrini portaoggetto da 35mm e posizionati all'interno di pozzetti delle piastre 6 wells. Sono state seminate circa 100000 cellule/pozzetto. Il giorno successivo il terreno di coltura viene cambiato e si comincia il trattamento con il Dexametasone. Dopo 24 h le cellule vengono trattate con il Cisplatino. Per ogni esperimento sono stati preparati anche dei campioni non trattati che sono stati utilizzati come controlli negativi.

Al termine dei tempi di incubazioni viene rimosso il terreno di coltura, vengono effettuati dei lavaggi in PBS 1X (Gibco, BRL) dopodichè le cellule vengono fissate per 30 min. in paraformaldeide a T.A. Finita l'incubazione si effettuano due lavaggi sempre con il PBS 1X. Le cellule sono sottoposte alla prima colorazione con la Falloidina-TRITC (SIGMA), che si lega al citoscheletro alla concentrazione di 100ng/ml per 2h di incubazione a T.A. Finita l'incubazione si fa un lavaggio in PBS 1X e si

effettua la seconda colorazione con il DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) (SIGMA), che interagisce con il DNA, alla concentrazione di 1,09 µg/ml per 20 min. Infine i vetrini vengono posizionati sui vetrini portaoggetti e montati con il Glicerolo (SIGMA) al 20% e osservati al microscopio ottico a fluorescenza (Nikon TE 2000-U, Italia).



#### ***2.1.4 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI PATHWAYS APOPTOTICI***

L'immunocitochimica è stata effettuata per valutare l'espressione dei pathways apoptotici nelle OC-k3 trattate con Dexametasone e Cisplatino. Questa analisi si avvale dell'utilizzo di Anticorpi primari e Anticorpi secondari coniugati con fluorofori, che generano un complesso immunitario con la proteina di interesse.

Per l'analisi di immunocitochimica le concentrazioni usate sono :

- ✓ Dexametasone: 50nM, 100nM, 250nM
- ✓ Cisplatino: 13µM, 25µM

I tempi di incubazioni sono:

- ✓ 24h
- ✓ 48h

Le OC-k3 sono seminate su vetrini portaoggetto in piastre 6 wells, alla concentrazione di 100000 cellule/pozzetto e sono lasciate aderire per 24h. Il giorno successivo il terreno di coltura viene cambiato e dopo si trattano le cellule con il dexametasone. Dopo 24h le cellule vengono trattate con il Cisplatino.

Per ogni esperimento effettuato sono stati preparati anche due campioni non trattati, uno dei quali rappresenta il controllo per l'esperimento e l'altro come controllo per la reazione immunocitochimica (NT solo secondario).

Passati i tempi di incubazione il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS1X, dopodiché le cellule sono state fissate con PFA 4% per 30 min. a T.A. Infine si effettua un lavaggio con PBS 1X prima di procedere con l'immunocitochimica.

Le cellule sono state permeabilizzate con PBS 1X e Tween-20 all' 1% per 15 min. a T.A., dopodiché le cellule sono state lavate due volte con PBS 1X 5 min.

In seguito sono stati bloccati i siti aspecifici con il Blocking Buffer costituito da PBS 1X e Siero in camera umida a T.A.

Dopo 30 minuti di incubazione i campioni sono stati trattati con l'anticorpo primario (Ab I, Santa Cruz) diluito in PBS 1X e l'1% di siero e lasciati in camera umida a 4°C in frigorifero overnight. In uno dei vetrini di controllo le cellule non sono state trattate con l'anticorpo primario, ma solo PBS 1X e l'1% di siero. Questo campione è molto importante perché permette di valutare se l'anticorpo secondario si lega a siti aspecifici.

Conclusa l' incubazione overnight si fanno due lavaggi con PBS 1X 5 min, dopodiché le cellule vengono trattate con l'anticorpo secondario (AbII, Santa Cruz) legato al fluoro foro FITC (fenilisotiocinato), diluito in PBS 1X ed incubato in camera umida per 30 min. a T.A. al buio.

Dopo l'incubazione si effettuano due lavaggi con PBS 1X ed infine i nuclei cellulari sono stati colorati con DAPI (1,09  $\mu$ M) per 10 min. a T.A. al buio.

Si effettuano dopo due lavaggi con PBS 1X ed infine le cellule posizionate sui vetrini vengono montate con vetrini copri oggetto con glicerolo al 20%.

I campioni vengono osservati al microscopio ottico a fluorescenza (Nikon TE 2000-U, Italia) e le immagini sono state elaborate con il programma MetaMorph 6.1(Universal Imaging Corporation).

In tabella 1 sono riportate le diverse concentrazioni e combinazioni degli anticorpi utilizzati.

<b>PRIMARIO</b>		<b>SIERO</b>		<b>SECONDARIO</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Tipo</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Tipo</b>	<b>Concentrazione</b>
Citocromo C (goat)	1:200	rabbit	1:20	Anti-goat fitc	1:500
GR (rabbit)	1:200	goat	1:20	Anti-rabbit fitc	1:500
Caspasi 3 (rabbit)	1:200	goat	1:20	Anti-rabbit fitc	1:500
Caspasi 8 (rabbit)	1:200	goat	1:20	Anti-rabbit fitc	1:500
Caspasi 9 (rabbit)	1:200	goat	1:20	Anti-rabbit fitc	1:500
P 53 (rabbit)	1:200	goat	1:20	Anti-rabbit fitc	1:500

Tabella 1: AbI, AbII e sieri utilizzati per l'indagine di immunocitochimica e relative concentrazioni.

## 2.2 L'EFFETTO PROTETTIVO *IN VIVO* DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO

Nel modello sperimentale *in vivo* sono stati utilizzati i ratti Wistar (Charles River, Italy) adulti di trenta giorni. Gli animali potevano accedere liberamente al cibo e all'acqua.

Gli animali sono stati trattati con il Dexametasone e il Cisplatino per verificare sia gli effetti tossici di queste due sostanze sia se il Dexametasone fosse in grado di proteggere le strutture dell' orecchio interno dall'azione tossica del Cisplatino.

Prima dei trattamenti gli animali sono stati sottoposti all' ABR per verificare se gli animali erano in grado di sentire.

La tecnica dell' ABR è stata effettuata anche prima dei sacrifici per verificare se i trattamenti con il Dexametasone e il Cisplatino avevano provocato dei danni (i dati non sono stati riportati in questa sede).

### **Trattamenti:**

Per questa serie di esperimenti, i ratti sono stati suddivisi in quattro gruppi di trattamento con 2 animali per ciascun gruppo:

- ✓ 9 animali trattati al giorno 0 al giorno 2 con soluzione fisiologica
- ✓ 9 animali trattati al giorno 0 e 2 con soluzione fisiologica e 1h dopo con Cisplatino (3,3mg/Kg) (Pharma, Italy)
- ✓ 9 animali trattati al giorno 0 e al giorno 2 con il Dexametasone (100µg/Kg) (Fortecortin, Merck Farma Quimica, Germania)
- ✓ 9 animali trattati al giorno 0 e al giorno 2 con il Dexametasone e dopo 3 h con il Cisplatino
- ✓ Al giorno 5 gli animali vengono sacrificati

I ratti trattati con la soluzione salina rappresentano il controllo sano, per cui non si troveranno alterazioni né nell'udito né nelle strutture dell'orecchio interno.

I ratti trattati con il Cisplatino rappresentano il controllo positivo in quanto si vuole verificare l'effetto ototossico del farmaco.

I ratti trattati con il con il Dexametasone rappresentano il controllo negativo in quanto si vuole verificare la non dannosità del farmaco antiinfiammatorio.

Infine i ratti trattati sia con il Dexametasone (somministrato 48h e 3h prima rispetto al Cisplatino) sia con il Cisplatino servono per determinare se il Dexametasone sia in grado di proteggere le strutture dell'orecchio interno dall'azione tossica del Cisplatino.

Tutti i farmaci e la soluzione salina sono stati somministrati con iniezione intraperitoneale.

Dagli animali sacrificati vengono espianate le coclee per diverse analisi:

- ✓ 1 coclea per analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)
- ✓ 1 coclea per l'analisi di immunohistologia

### **2.2.1 INDAGINE MORFOLOGICA: MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).**

Le coclee destinate alla microscopia elettronica a scansione sono state fissate in una soluzione di tetrossido di osmio all'1% per 2 ore a 4°C; dopodiché è stato effettuato un lavaggio in cacodilato di sodio 0.125 M per circa 5 minuti; infine si è proceduto con la disidratazione in alcool secondo il seguente ordine:

- ✓ Alcool 50%      2x10 min
- ✓ Alcool 70%      2x10 min
- ✓ Alcool 80%      2x10 min
- ✓ Alcool 90%      2x10 min
- ✓ Alcool 100%     2x10 min
- ✓ Alcool 110%     2x10 min

Inseguito le coclee sono state sottoposte al punto critico di disidratazione (Critical point) in cui è stato utilizzato come fluido di transizione la CO<sub>2</sub> a 31,3°C e 72,9 Atm. Questo è stato eseguito per fare in modo che la disidratazione non alteri la morfologia di superficie, in modo da impedire il collasso delle strutture durante la disidratazione.

Infine i campioni sono stati montati su un supporto di alluminio, ricoperti con una lamina d'oro ed osservati al SEM presso il Centro di Microscopia Elettronica dell'Università degli Studi di Ferrara.

### ***2.2.2 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER STRUTTURALI E DEI PATHWAYS APOPTOTICI***

L'immunoistochimica è stata effettuata per valutare l'espressione dei pathways apoptotici nelle sezioni di coclee ottenute da animali trattati con Dexametasone e Cisplatino. Questa analisi si avvale dell'utilizzo di Anticorpi primari e Anticorpi secondari, che generano un complesso immunitario con la proteina di interesse.

Le coclee sono incluse in paraffina, sezionate con il microtomo (spessore di 5 µm) e posizionate su vetrini portaoggetto polarizzati.

Le sezioni vengono sparaffinate mediante incubazione in xilolo e xilolo/etanolo, dopodiché vengono reidratate attraverso passaggi in diverse gradazioni di alcol (da alcool 100% fino ad alcool 50%) e infine lavate con acqua distillata.

Poi si effettua un bloccaggio delle perossidasi endogene affinché non interagiscano con la rilevazione del complesso immunologico. Il bloccaggio delle perossidasi avviene incubando i campioni in una soluzione di acqua ossigenata all'1% in una soluzione di TBS 1X per 30 min. a T.A. Passato il tempo si effettua un lavaggio con TBST (TBS 1X + TRITON100 0.1%). Successivamente si effettua un blocking buffer composto da TBS1X e Siero al 5%, l'incubazione avviene a T.A. per 45 min, passato il tempo non si effettuano lavaggi, ma si incuba direttamente con l'anticorpo primario. La soluzione è composta da TBS 1X, Siero all' 1% e Anticorpo primario (elenco degli Anticorpi primari usati sono in tabella 2), l'incubazione è overnight a 4°C.

Il giorno successivo dopo un lavaggio con TBST e si trattano i campioni incubandoli in una soluzione composta da TBS1X, Siero 1% e Anticorpo Secondario 1:200, per 30 min. a T.A., alla fine si esegue un lavaggio in

TBST. Dopodiché si prepara il terreno per le perossidasi seguendo il protocollo del ABC kit (VECTOR, Milano, IT): si prepara una soluzione composta da TBS1X aggiunto delle soluzioni A e B (complesso Avidina – Biotina), l'incubazione è di 30 min a T.A. in seguito si effettuano due lavaggi in TBST e TBS e si prepara una soluzione per la rilevazione (SG VECTOR, Milano, IT), composta da TBS, acqua ossigenata e il cromogeno; l'incubazione è di 5-10 min sempre a T.A.

Infine si passa alla disidratazione dei campioni nelle diverse gradazioni di alcoli (da alcool 50% fino ad alcool 100%) e poi nello xilolo/etanolo e nello xilolo.

L'ultimo step consiste nel chiudere i vetrini con l'eukit; per fare asciugare i vetrini bisogna metterli su una piastra riscaldante per almeno 48h.

Mediante l'analizzatore Nikon Eclipse 80 *i* ed il programma Nis-Elements AR si acquisiscono le immagini relative alla morfologia e all'espressione proteica delle sezioni di coclea.

<b>PRIMARIO</b>		<b>SIERO</b>		<b>SECONDARIO</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Concentrazion e</b>	<b>Tipo</b>	<b>Concentrazion e</b>	<b>Tipo</b>	<b>Concentrazion e</b>
Citocromo C (goat)	1:50 1:200	rabbit	1:20	Anti-goat	1:200
GR (rabbit)	1:50 1:200	goat	1:20	Anti-rabbit	1:200
Caspasi 3 (rabbit)	1:50 1:200	goat	1:20	Anti-rabbit	1:200
Caspasi 8 (rabbit)	1:50 1:200	goat	1:20	Anti-rabbit	1:200
P 53 (rabbit)	1:50 1:200	goat	1:20	Anti-rabbit	1:200
Myo VII A	1:50 1:200	rabbit	1:20	Anti-rabbit	1:200
NF200	1:50 1:200	rabbit	1:20	Anti-rabbit	1:200

Tabella 2: Elenco degli anticorpi primari utilizzati e le relative concentrazioni.



### ***2.3 MESSA A PUNTO DEL SISTEMA DI TRASFEZIONE NON VIRALE***

Questo lavoro è stato eseguito in collaborazione con l'Università di Sheffield (UK) che ci ha permesso l'utilizzo delle human fetal auditory stem cells (hFASC).

Questo progetto consiste nell'ottimizzare un protocollo di trasfezione non virale, per una futura applicazione di terapia genica nel trattamento di patologie che colpiscono l'apparato uditivo.

Le hFASC vengono prelevate da coclea fetali tra la nona e la dodicesima settimana di gestazione.

Le coclee vengono rimosse dal tessuto circostante utilizzando una soluzione sterile (soluzione Hanks) dopodiché l'epitelio cocleare così ottenuto viene sezionato e le piccole porzioni vengono posizionate in petri con 100µl di terreno di coltura (DMEM: high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen, Carlsbad, CA, e 10% di FBS) ed infine vengono incubate a 37°C overnight.

Il giorno successivo le piccole porzioni di epitelio cocleare vengono dissociate ulteriormente avvalendosi della tripsina 0.125% in Hanks solution per 15 min. a T.A.

La dissociazione viene facilitata dall'utilizzo di puntali da pipetta sia da 200µl sia da 1000µl, in questa maniera si ottengono le singole cellule, che vengono posizionate in petri con un terreno di coltura tipico per le cellule staminali derivanti dalla regione otica (Otic Stem Cell Full Media: OSCFM). Una volta ottenute e messe in coltura, le cellule vengono incubate a 37°C.

### **2.3.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI TRASFEZIONE**

#### **2.3.1.1 COLTURA CELLULARE DELLE HUMAN FETAL AUDITORY STEM CELLS**

Le hFASC sono mantenute in adesione in fiasche T25 in condizioni permissive alla temperatura di 37°C in un mezzo di coltura costituito da:

- DMEM high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium( Invitrogen, Carlsbad, CA)
- 10% FBS (fetal Bovine Serum; Gibco BRL)

Il terreno di coltura viene cambiato ogni due giorni e nel momento che si ottiene la confluenza le cellule vengono staccate con la Trypsina in soluzione sterile di Hanks + HEPES (1/200.000).

Una volta aggiunta la tripsina in soluzione di Hanks le cellule vengono centrifugate per 5 min a 1000 giri. Finita la centrifuga viene rimosso il terreno e mantenuto il pellet a cui si aggiungerà nuovo terreno di coltura. Le cellule poi vengono nuovamente riseminate alle opportune diluizioni.

Le cellule vengono mantenute in incubatore a 37°C.

### 2.3.1.2 MESSA A PUNTO DEL SISTEMA DI TRASFEZIONE NON VIRALE

Si è deciso di trasfettare le hFASC per verificare se si è in grado di modificare geneticamente delle cellule staminali, inserendo nel loro genoma un gene per la Green Fluorescent Protein (GFP), utilizzando due separati plasmidi derivanti dal sistema trasponibile *Sleeping Beauty* (SB).

Il gruppo del Dr Ivics è stato in grado di produrre due plasmidi, uno che porta il gene che si vuole inserire nel genoma delle cellule ospiti (pT2/Venus: gene per la GFP) e un plasmide contenente invece il gene per la trasposasi (SB100), partendo dalla sequenza consenso dell'elemento trasponibile SB (Fig 28).

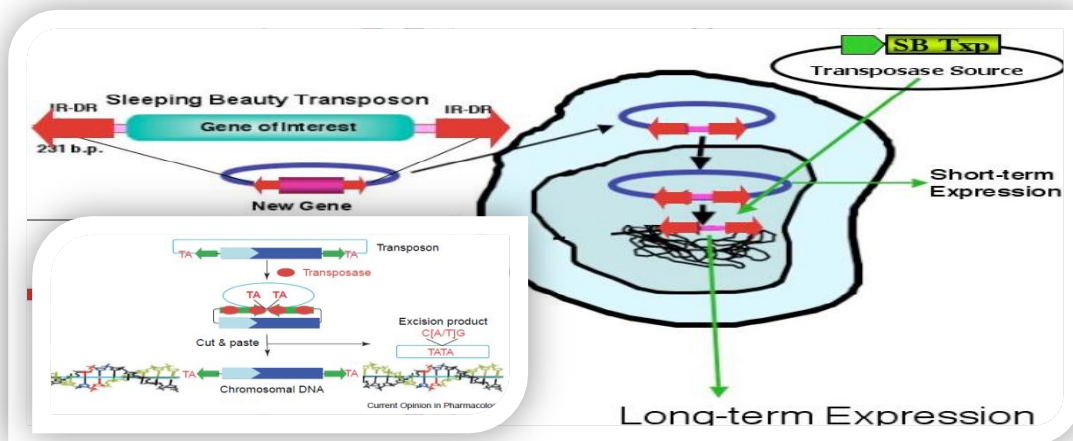


Fig 28: Rappresentazione formazione dei due plasmidi: pT2/Venus e SB100

Per determinare se le cellule sono state trasfettate si osservano con il microscopio a fluorescenza 24 h dopo la trasfezione.

I plasmidi sono stati testati a differenti concentrazioni per verificare se generano tossicità alle hFASC sia da soli che in co-trattamento.

Le diverse combinazioni di dosi dei plasmidi testate sono elencate nella seguente tabella (tabella 3)

<b>Plasmidi</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Concentrazione</b>	<b>Concentrazione</b>
<b>pT2/Venus</b>	500ng	62.5ng	30ng	5ng
<b>pT2/Venus</b> + <b>SB100</b>	V1000 ng+Sb100 25 ng	V1000 ng+Sb100 10 ng	V 500 ng+Sb 100 1000 ng	V500 ng+Sb 100 750 ng
	V500 ng+Sb 100 500 ng	V500 ng+Sb 100 250 ng	V500 ng+Sb 100 125 ng	V500 ng+Sb 100 62.5 ng
	V500 ng+Sb100 10 ng	V250 ng+Sb100 10ng	V125 ng+Sb100 10 ng	V62.5 ng+Sb100 10ng
	V60 ng+Sb100 10ng	V30 ng+Sb100 10 ng	V15 ng+Sb 100 2 ng	V5 ng+Sb100 1 ng
	V30ng+Sb100 15ng	V15ng+Sb100 7.5ng	V7.5ng+Sb100 3ng	

Tabella 3: dosi dei plasmidi somministrati da soli e in co-trattamento

Le cellule vengono seminate in piastre da 24 wells con una concentrazione di 10000 cellule/pozzetto con un terreno di coltura formato da DMEM e 10% FBS 24 h prima della trasfezione, che viene eseguita secondo il protocollo del kit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)

Il giorno seguente si preparano delle provette in cui vengono messi dell'Opti-Mem e i plasmidi e si incubano per 5 min a T.A. Passato il tempo si aggiungono 1.5 µl di lipofectamina per ogni provetta e si incubano per 30 min. a T.A.

Nel frattempo viene cambiato il terreno nei pozzetti e si aggiunge il terreno fresco.

Passati i 30 min. si aggiunge in ogni pozzetto il contenuto della provetta (Optoi-Mem, plasmidi, ilpofectamina) e si incubano a 37°C per 6 h.

Passate le 6 h si cambia il terreno in ogni pozzetto con terreno di coltura fresco e si incubano nuovamente a 37°C.

Passate 24h dalla trasfezione si osservano le cellule con il microscopio a fluorescenza per verificare l'avvenuta trasfezione.

A diversi tempi sono state valutate sia la tossicità dei vettori sia l'efficienza di trasfezione quantificando al microscopio a fluorescenza la numerosità delle cellule vitali e delle cellule in grado di esprimere la GFP (cellule trasfettate, che risultano di colore verde).

### ***2.3.2 VERIFICA DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER DELLE CELLULE STAMINALI INDIFERENZIALE***

Si è deciso di valutare se le cellule staminali erano ancora capaci di esprimere i marker tipici delle cellule staminali indifferenziate dopo la trasfezione mediante immunocitochimica. I marker che si sono ricercati sono: PAX2, SOX2, OCT4.

Le cellule 15 giorni dopo la trasfezione sono state seminate su vetrini portaoggetto.

In seguito sono state lavate con PBS1X per togliere i residui del terreno di coltura, fissate con una soluzione contenente 4% di PFA per 10 min a T.A., e lavate con PBS 1X.

Dopodiché si bloccano le cellule con una soluzione blocking buffer costituita da PBS-Triton e 5% di Siero per 30 min. a T.A. e nel frattempo si preparano le soluzioni contenenti PBS 1X, Siero 1% e Anticorpi primari 1:100. L' incubazione con l'Anticorpo primario è overnight a 4°C.

Il giorno successivo si fanno due lavaggi con il PBS 1X e successivamente si incubano i campioni con l'Anticorpo secondario in una soluzione composta da PBS1X, Siero 1% e Anticorpo Secondario 1:250 per 1h a T.A.

Finita l' incubazione si fanno due lavaggi con PBS1X e dopo si incuba con il DAPI in una soluzione costituita da PBS1X e DAPI, per 10 min. a T.A.

Finita l'incubazione si effettuano due lavaggi con PBS ed infine si chiudono i vetrini con una soluzione Slowfade Gold e si pongono in freezer ( a -20°C).

### **2.3.3 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC TRASFETTATE IN NEURONI BIPOLARI E CELLULE SIMILI ALLE CELLULE STAMINALI**

#### **2.3.3.1 EFFICIENZA DI TRASFEZIONE DELLE hFASC UTILIZZANDO LA MIGLIORE CONCENTRAZIONE DI PLASMIDI**

In questa nuova serie di esperimenti si è deciso di trasfettare le cellule seguendo il protocollo descritto precedentemente, ma con alcune modifiche utilizzando le seguenti concentrazioni di plasmidi:

- ✓ pT2/Venus only: 62.5 ng
- ✓ pT2/Venus+SB100 10 ng

Le cellule vengono seminate in piastre da 6 wells con una concentrazione di 40000 cellule/pozzetto con un terreno di coltura formato da DMEM e 10% FBS 24 h prima della trasfezione.

Il giorno seguente si preparano delle provette in cui vengono messi dell'Opti-Mem e i plasmidi e si incubano per 5 min a T.A. Passato il tempo si aggiungono 1.5 µl di lipofectamina per ogni provetta e si incubano per 30 min. a T.A.

Nel frattempo viene cambiato il terreno dei pozzetti e si aggiunge il terreno fresco.

Passati i 30 min. si aggiunge in ogni pozzetto il contenuto della provetta (Optoi-Mem, plasmidi, ilpofectamina) e si incubano le cellule a 37°C per 6 h.

Passate le 6 h si cambia il terreno in ogni pozzetto con terreno di coltura fresco e si incubano nuovamente a 37°C.

Come sempre le cellule verranno osservate il giorno successivo per verificare se la trasfezione è avvenuta utilizzando il microscopio a fluorescenza.

#### ***2.3.3.2 SELEZIONE DELLE hFASC***

La selezione è un passaggio estremamente importante per ottenere in coltura solo le cellule staminali, ma è anche un procedimento molto stressante e pericoloso per le cellule.

Per ottenere solo cellule staminali bisogna togliere dal terreno di coltura l'FBS e aggiungere particolari fattori di crescita.

Quindi il terreno di coltura per la selezione è costituita da: DMEM, N2 supplement, B27, bFGF, EGF, IGF.

Per completare la selezione ci vogliono circa 15 giorni, mentre per arrivare alla confluenza in una fiasca T25 serve 1 mese.



### **2.3.3.3 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC IN NEURONI BIPOLARI E CELLULE SIMILI ALLE CELLULE CIGLIATE**

Le hFASC sono in grado di differenziare in neuroni bipolari e in cellule simili alle cellule cigliate se sottoposte a giuste condizioni.

In questa serie di esperimenti si è deciso di eseguire la differenziazione dopo che le cellule sono state prima trasfettate e poi selezionate.

Si seminano 40000 cellule/pozzetto in una piastra 6 wells e si incubano a 37°C 24 h prima della differenziazione.

#### **2.3.3.3.1 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC IN NEURONI BIPOLARI**

Per la differenziazione in neuroni bipolari le cellule prima di essere seminate devono essere staccate utilizzando la trypsina. Questa sostanza è fondamentale per la differenziazione in neuroni bipolari (il meccanismo d'azione non è ancora conosciuto).

Il protocollo eseguito per la differenziazione in neuroni bipolari è:

- ✓ Dal giorno 0 a 4 il terreno è composto da: DFBN (Dmem,F12,N2,B27), bFGF , Shh,
- ✓ Dal giorno 4 al 7 il terreno è composto da: DFBN (Dmem,F12,N2,B27), bFGF , Shh, BDNF, NT3
- ✓ Dal giorno 7 al 14 il terreno è composto da: DFBN (Dmem,F12,N2,B27), bFGF, NT3, BDNF

Il terreno di coltura viene sostituito ogni due giorni.

Per ottenere l'espressione dei marker tipici dei neuroni bipolari servono 15 giorni

#### ***2.3.3.3.2 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC IN CELLULE SIMILI IN CELLULE CIGLIATE***

Per la differenziazione in cellule cigliate prima di essere seminate, le cellule devono essere staccate utilizzando la soluzione enzyme free. Questa sostanza è fondamentale per la differenziazione in cellule cigliate.

Il protocollo eseguito per la differenziazione in cellule cigliate è:

- ✓ Dal giorno 0 al giorno 14 il terreno di coltura è composto da : DFBN (Dmem,F12,N2,B27), EGF, ACIDO RETINOICO.

Il terreno di coltura viene sostituito ogni due giorni.

Per ottenere l'espressione tipica dei marker delle cellule cigliate servono 15 giorni.

## 2.4. INDAGINE STATISTICA

Al fine di valutare la attendibilità dei dati raccolti, ogni esperimento è stato ripetuto per almeno quattro volte. I dati ricavati dai vari esperimenti sulla vitalità cellulare (citofluorimetria a flusso), sulla vitalità ed efficacia di trasfezione (lavoro di collaborazione con l' Università di Sheffield ) sono stati analizzati con il programma GraphPad Prism Version 5.03. Per rendere più completa l'indagine statistica si è definita la probabilità d'errore d'analisi significativa per valori di  $p < 0.05\%$ , e altamente significativa per valori di  $p < 0.01$ .

### **3 RISULTATI**

In questo capitolo verranno descritti i risultati suddivisi in lavoro *in vitro* e in il lavoro *in vivo* riguardanti l'effetto protettivo del dexametasone rispetto al Cisplatino, e il lavoro *in vitro* svolto presso l'Università di Sheffield, che riguarda la messa a punto del sistema di trasfezione non virale.

#### **3.1. L'EFFETO PROTETTIVO *IN VITRO* DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO**

##### ***3.1.1 TEST DI TOSSICITA' E PROTEZIONE SULLE OC-k3 MEDIANTE CITOFUORIMETRIA A FLUSSO***

Per il lavoro *in vitro* si è deciso di valutare gli effetti del Dexametasone e del Cisplatino sulla linea cellulare OC-k3.

Queste cellule sono state utilizzate perché derivano dal tessuto epiteliale dell'Organo del Corti. L'espressione proteica della linea cellulare ha dimostrato che sono riconducibili alle cellule di supporto, che da letteratura sono note essere precursori delle cellule cigliate.

##### ***3.1.1.1 TEST DI TOSSICITÀ DEL CISPLATINO***

L'effetto delle sostanze testate è stato verificato tramite l'analisi di vitalità avvalendosi della citofluorimetria a flusso. Per una migliore chiarezza dei risultati ottenuti saranno descritti di seguito prima gli effetti dei farmaci somministrati singolarmente e in seguito in cotrattamento.

Nel grafico riportato in figura 29 è riportato l'effetto tossico del Cisplatino considerando sia diversi tempi di incubazione sia le due dosi testate. Come

si può vedere la tossicità è tempo dipendente in quanto la mortalità cellulare aumenta con il passare del tempo.

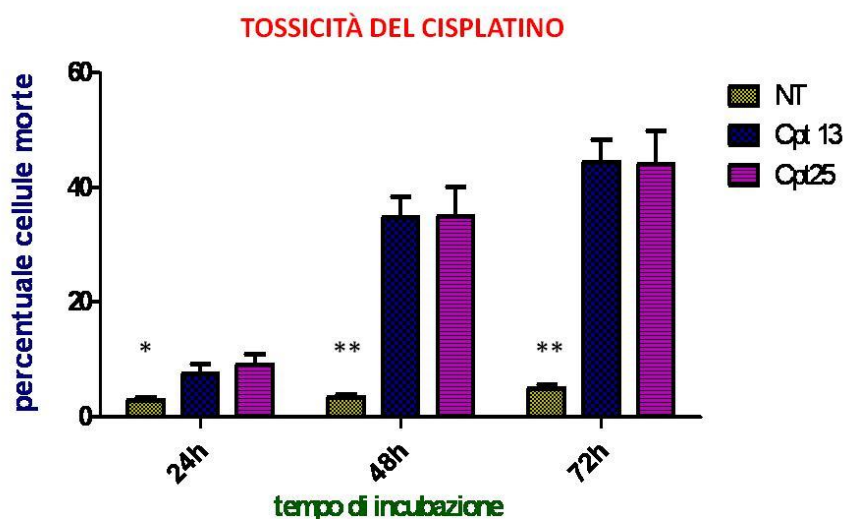


Fig 29: Grafico della tossicità indotta dal Cisplatino sulla linea cellulare OC-k3. In ascissa è indicato il tempo di incubazione espresso in ore (h), mentre in ordinata la percentuale di cellule morte. NT: non trattato; Cpt13: trattato con cisplatino 13 $\mu$ M; Cpt25: trattato con cisplatino 25 $\mu$ M. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Dai dati ottenuti si può affermare che dopo 24h di trattamenti la percentuale di mortalità cellulare nei campione trattati con il Cisplatino (13 e 25  $\mu$ M) è significativa in confronto con il campione non trattato ( $p < 0.05$ ). In quanto a mortalità cellulare è di circa il 17%, mentre nel campione non trattato la mortalità è di circa il 2%. Non è significativa però la differenza di mortalità tra le due dosi di Cisplatino testate.

Dopo 48 h di trattamento la percentuale di mortalità cellulare nei campioni trattati con il Cisplatino (13 e 25  $\mu$ M) è di circa 38%, mentre nei campioni non trattati la percentuale è del 4%, dunque la differenza è altamente significativa ( $p < 0.01$ ). Non lo è invece tra i due campioni trattati con il Cisplatino.

Dopo 72h di trattamento la percentuale di mortalità cellulare nei campioni trattati con il Cisplatino (13 e 25  $\mu$ M) è di circa 45%, mentre nei campioni non trattati la percentuale è del 5%, dunque la differenza è anche in questo caso altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

### 3.1.1.2 TEST DI TOSSICITÀ DEL DEXAMETASONE

Nel grafico in figura 30 è riportata la tolleranza delle OC-k3 rispetto a diversi dosaggi e tempi di incubazione di trattamento con il dexametasone.

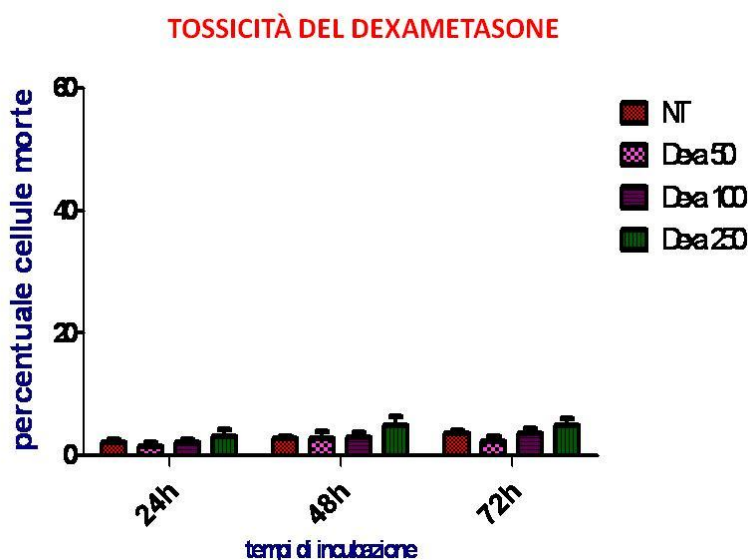


Fig 30 grafico della tossicità indotta dal Dexametasone sulla linea cellulare OC-k3. In ascissa è indicato il tempo di incubazione espresso in ore (h), mentre in ordinata la percentuale di cellule morte. NT: non trattato; Dexa 50: trattato con dexametasone 50nM; Dexa 100: trattato con dexametasone 100nM; Dexa 250: trattato con dexametasone 250 nM.

Dai dati ottenuti si è visto che il Dexametasone non genera tossicità alle cellule a nessuna concentrazione e a nessun tempo di incubazione. La mortalità cellulare a tutte le concentrazioni testate dopo 24 h risulta del 2%, dopo 48h è del 4% e dopo 72 h è del 6 %. La mortalità cellulare nei

campioni non trattati (NT) è del 2% dopo 24h, è del 3% dopo 48 h e è del 5% dopo 72h.

Si può dedurre che la mortalità del Dexametasone non è significativa tra le tre differenti concentrazioni, ma non lo è nemmeno a confronto con i campioni NT.

### 3.1.1.3 TEST DI PROTEZIONE DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO

Una volta che è stata effettuata la tossicità del Dexametasone si è voluto verificare se tale farmaco fosse anche in grado di proteggere le OC-k3 dall'azione tossica del Cisplatino. Per verificare l'effetto protettivo le cellule sono state pretrattate con il Dexametasone 24 h prima rispetto al Cisplatino.

Nel grafico in figura 31 sono riportati i dati di protezione del Dexametasone (50, 100 e 250 nM) rispetto al Cisplatino 13 $\mu$ M. Dai risultati ottenuti si può affermare che il Dexametasone è stato in grado di proteggere le OC-k3 dall'azione tossica del Cisplatino.

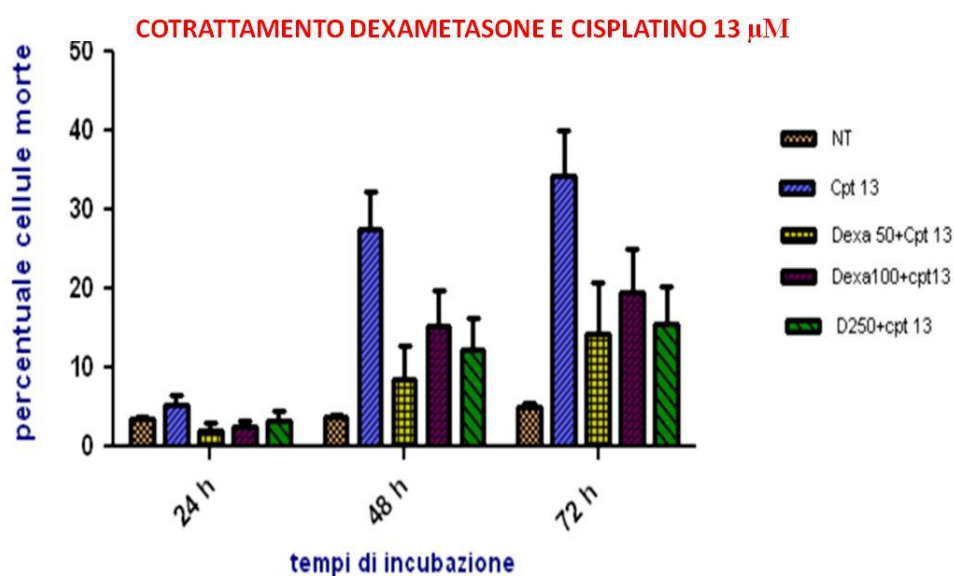


Fig 31. Grafico della protezione del Dexametasone rispetto al Cisplatino alla concentrazione 13 $\mu$ M. In ascissa è indicato il tempo di incubazione espresso in ore (h), mentre in ordinata la percentuale di cellule morte. NT: non trattato; Cpt13: trattato con cisplatino 13 $\mu$ M; Dexa 50+ Cpt13: trattato con dexametasone 50nM e cisplatino 13 $\mu$ M; Dexa 100+ Cpt13: trattato con dexametasone 100nM e cisplatino 13 $\mu$ M; Dexa 250+ Cpt13: trattato con dexametasone 250nM e cisplatino 13 $\mu$ M.

La maggiore protezione si è ottenuta pre-trattando le cellule con il Dexametasone alla concentrazione di 50 nM, infatti la mortalità si è ridotta circa del 40% (dopo 48h e 72h). Nei campioni pretrattati con il Dexametasone a 100 nM la mortalità si è ridotta del 35% (dopo 48h e 72h) e nei campioni pretrattati con il Dexametasone a 250nM la mortalità si è ridotta circa del 38% (dopo 48h e 72h).

Nel grafico in figura 32 sono riportati i dati di protezione del Dexametasone rispetto al Cisplatino alla concentrazione 25 $\mu$ M. Si può notare che il Dexametasone non è tossico a nessun tempo e a nessuna concentrazione, mentre la tossicità del Cisplatino è tempo dipendente. Nei campioni pretrattati con il Dexametasone e successivamente trattati con il Cisplatino la mortalità cellulare è ridotta rispetto al campione trattato solo con il Cisplatino.

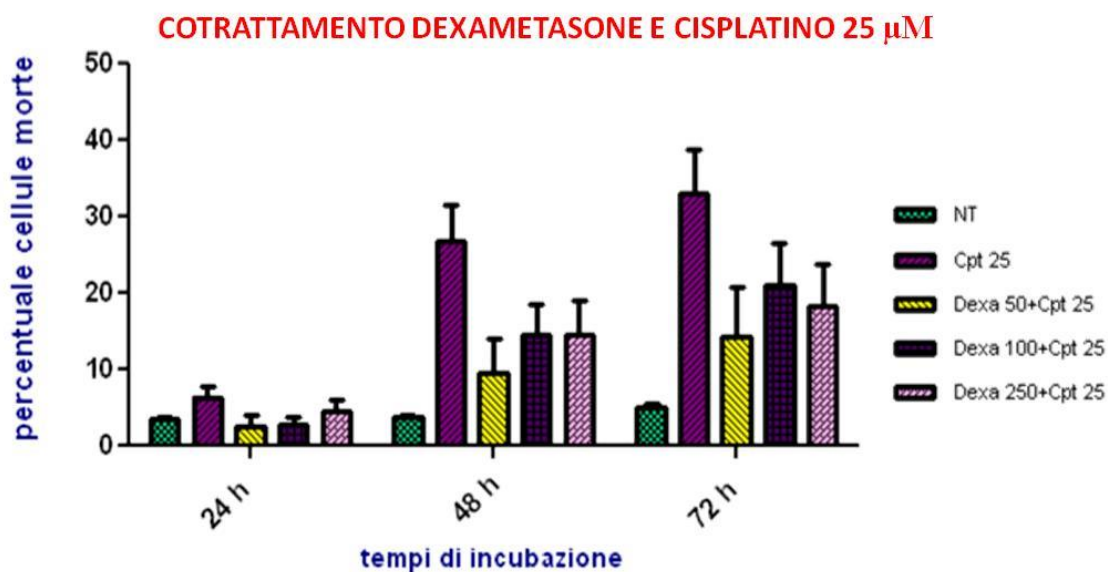




Fig 32 grafico della protezione del Dexametasone rispetto al Cisplatino alla concentrazione 25 $\mu$ M. In ascissa è indicato il tempo di incubazione espresso in ore (h), mentre in ordinata la percentuale di cellule morte. NT: non trattato; Cpt25: trattato con cisplatino 25 $\mu$ M; Dexa 50+ Cpt25: trattato con dexametasone 50nM e cisplatino 25 $\mu$ M; Dexa 100+ Cpt25: trattato con dexametasone 100nM e cisplatino 25 $\mu$ M; Dexa 250+ Cpt25: trattato con dexametasone 250nM e cisplatino 25 $\mu$ M.

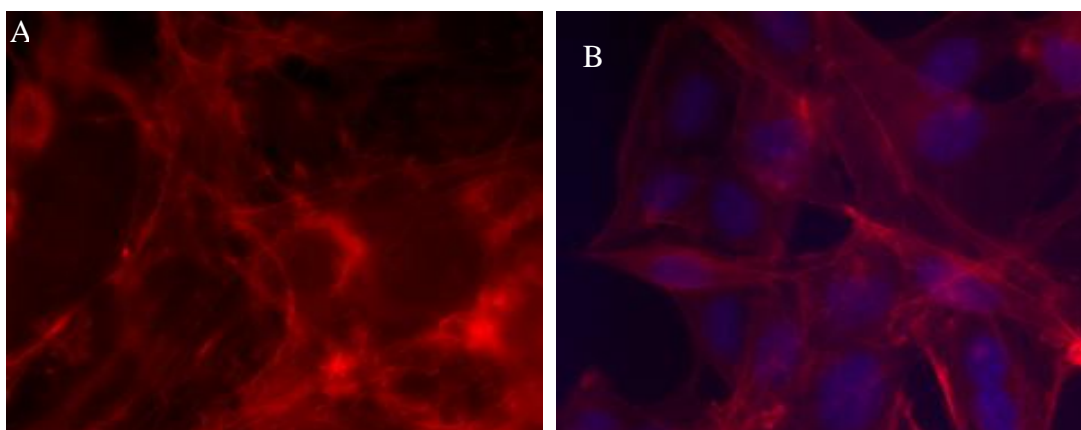
La maggiore protezione si è ottenuta pre-trattando le cellule con il Dexametasone alla concentrazione di 50 nM, infatti la mortalità si è ridotta circa del 50% (dopo 48h e 72h) Nei campioni pretrattati con il Dexametasone a 100 e 250 nM la mortalità si è ridotta del 38% dopo 48h e del 27% dopo 72h.

### **3.1.2 STUDIO MORFOLOGICO DEL CITOSCHELETRO E DELLA CONDENSAZIONE DELLA CROMATINA**

Si è deciso di indagare lo stato del citoscheletro dopo il trattamento con questi due farmaci a differenti tempi di incubazione e a differenti concentrazioni, in quanto si sa da letteratura che il Cisplatino è in grado di alterare i microfilamenti del citoscheletro. Poi si è voluto verificare anche se il Dexametasone è in grado di proteggere il citoscheletro dall'azione tossica del Cisplatino.

Per una miglior chiarezza dei risultati, poichè non sono state notate significative differenze tra le dosi 13 $\mu$ M e 25 $\mu$ M di cisplatino come anche alle diverse dosi di Dexametasone, di seguito vengono riportati solo i dati ottenuti dai trattamenti con i farmaci alle concentrazioni di cisplatino 25 $\mu$ M e dexametasone 250 nM.

Dalle immagini riportate in figura 33 si può notare che dopo 24h dalla fine dei trattamenti le cellule mostrano un citoscheletro in buono stato, senza nessuna alterazione evidente. I filamenti di actina sono integri e ben distribuiti all'interno della cellula e i nuclei sono intatti.



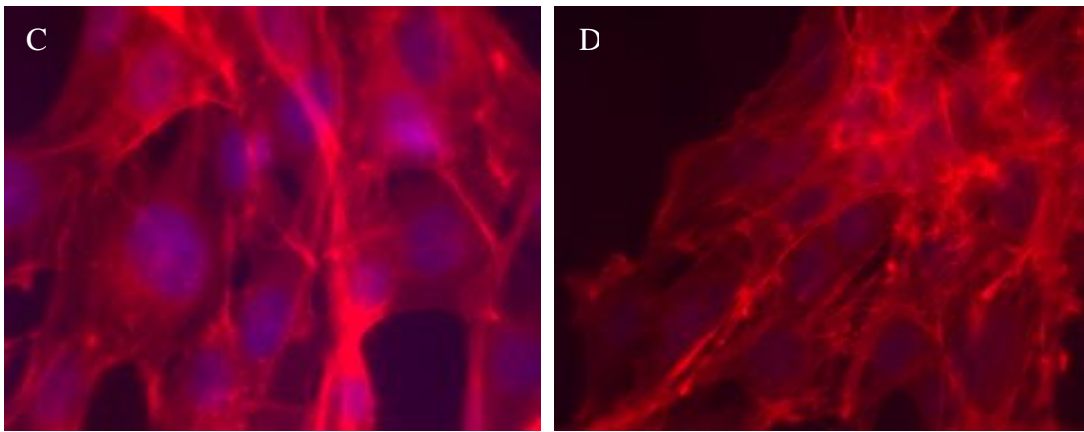


Fig. 33 effetto del cisplatino dopo 24h di trattamento: analisi dello stato del citoscheletro e dei nuclei sulle OC-k3 pre-trattate con il Dexametasone 24h prima del Cisplatino. Falloidina TRITC in rosso, DAPI in blu. A: campione non trattato; B: Cisplatino 25µM, C: Dexametasone 250nM + Cisplatino 25µM, D: Dexametasone 250 nM.

Nelle immagini riportate in figura 34 si può notare lo stato del citoscheletro 48h dopo la fine dei trattamenti

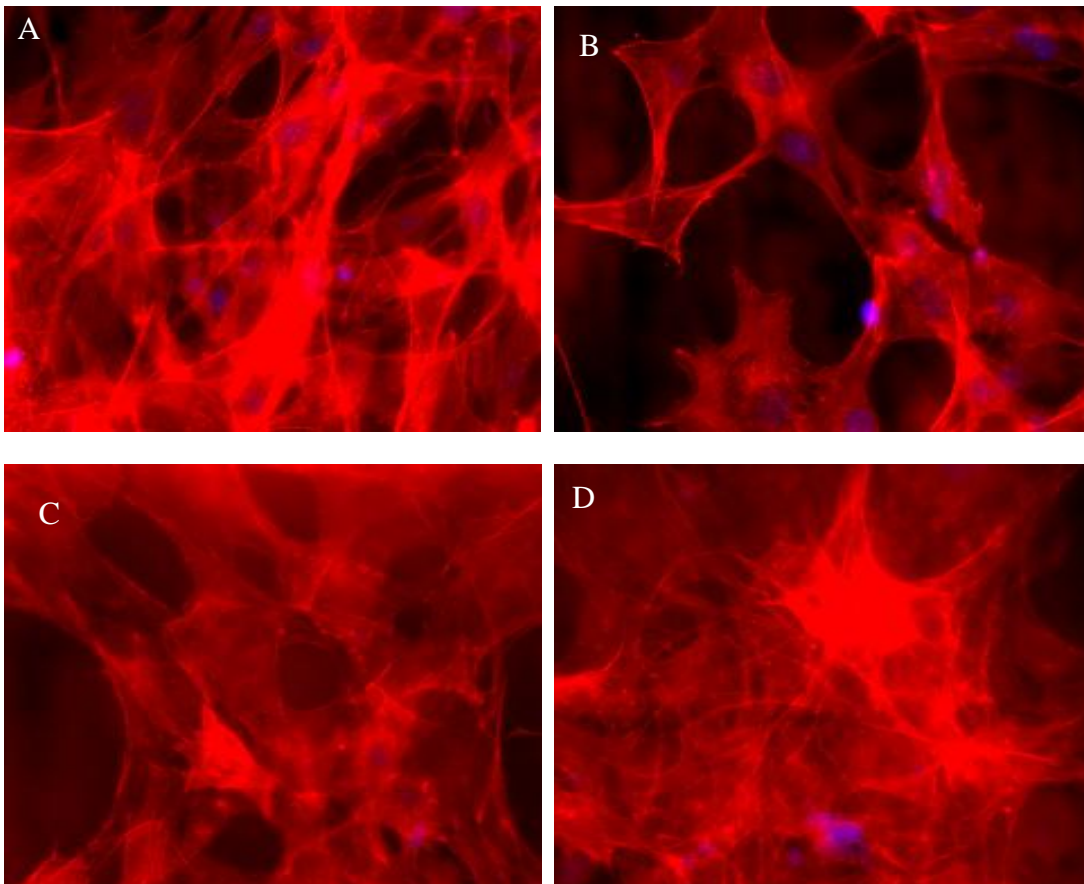


Fig 34- effetto del cisplatino dopo 48h di trattamento: analisi dello stato del citoscheletro e dei nuclei sulle OC-k3 pre-trattate con il Dexametasone 24h prima del Cisplatino. Falloidina TRITC in rosso, DAPI in blu. A: campione non trattato; B: Cisplatino 25 $\mu$ M, C: Dexametasone 250nM + Cisplatino 25 $\mu$ M, D: Dexametasone 250 nM.

Come si può vedere da queste immagini (Fig 34) la situazione delle cellule è completamente diversa alle 48h rispetto alle 24h. Infatti le cellule trattate con il Dexametasone (Fig 34-C) e il NT (Fig 34-A) mostrano un citoscheletro in buono stato, con i filamenti di actina perfettamente integri e i nuclei intatti. Nel caso, invece, del Cisplatino (Fig 34-B) il citoscheletro mostra notevoli alterazioni, in quanto i filamenti di actina hanno subito un fortissimo assottigliamento e in qualche caso anche delle rotture; i nuclei invece sono ancora integri. Nel caso del co-trattamento Dexametasone e Cisplatino (Fig 34-D) il citoscheletro non mostra alterazioni, i filamenti di actina sono integri così come i nuclei; si può affermare che il Dexametasone ha generato un effetto protettivo rispetto l'azione tossica del cisplatino a livello citoscheletro.

### 3.1.3 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI PATHWAYS APOPTOTICI

È stata valutata la protezione del Dexametasone rispetto all'azione citotossica del Cisplatino mediante l'analisi immunocitochimica dell'espressione di alcuni marcatori apoptotici e verificando l'espressione del recettore del glucocorticoide (ad indicare l'attivazione del dexametasone) (Fig.35, 36, 37).

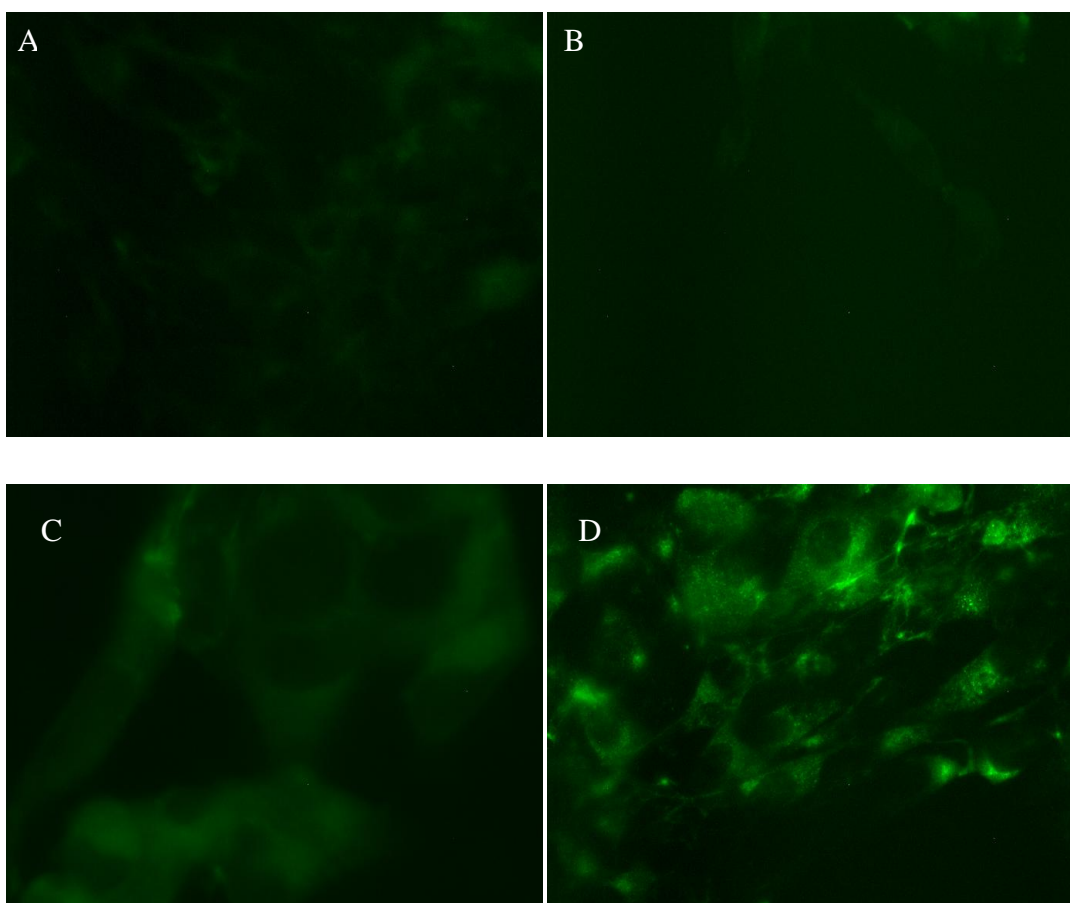


Fig.35 Espressione del recettore del glucocorticoide (GR) (in verde) dopo 48 ore di trattamento con il cisplatino. A: campione non trattato; B: Cisplatino 25 $\mu$ M, C: Dexametasone 100nM + Cisplatino 25 $\mu$ M, D: Dexametasone 100 nM.

Come si può notare in figura 35 il recettore dei glucocorticoidi è maggiormente espresso nei campioni trattati con il Dexametasone da solo (D) e in co-trattamento con il Cisplatino (C). Tale espressione è dovuta al

fatto che le cellule sono state trattate con un glucocorticoide, che interagisce con il suo recettore, attivandolo.

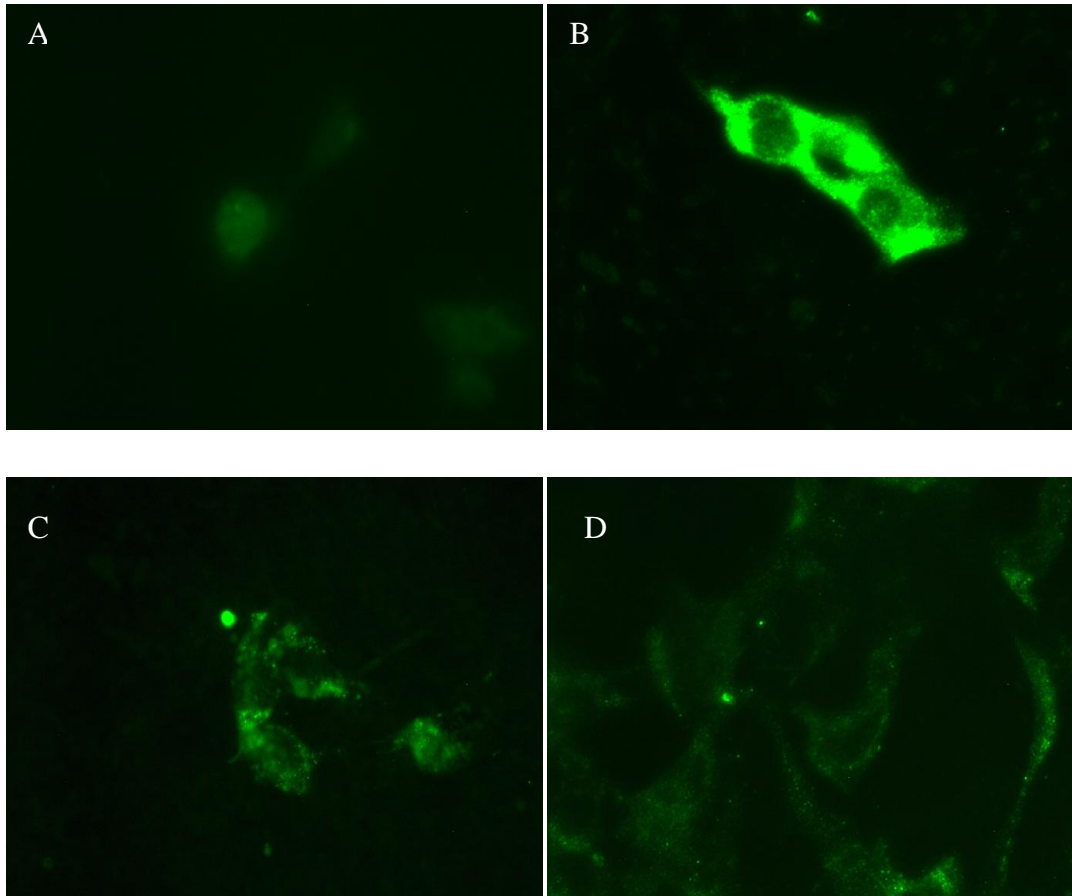


Fig.36 espressione del Cytocromo C (in verde) dopo 48 ore di trattamento con il cisplatino. A: campione non trattato; B: Cisplatino 25 $\mu$ M, C: Dexametasone 100nM + Cisplatino 25 $\mu$ M, D: Dexametasone 100 nM.

Dalle immagini riportate in figura 36 si può notare che nel campione NT (Fig 36-A) e nel campione trattato con il Dexametasone (Fig 36-D) da solo la fluorescenza è puntiforme, in quanto il Cytocromo c è localizzato all'interno del mitocondrio.

Nel caso del campione trattato con il Cisplatino (Fig 36-B) la fluorescenza è molto marcata ed è diffusa in tutto il citoplasma, ciò indica che il Cytocromo c è stato rilasciato dal mitocondrio per diffondersi in tutto il citoplasma, quindi dimostra che il processo apoptotico è avviato.

Nel campione in co-trattamento (Fig 36-C) si visto che la fluorescenza è ancora puntiforme, ciò indica che il Dexametasone è stato in grado di rallentare l'insorgere dell'apoptosi.

Da letteratura si sa che quando l'apoptosi per via intrinseca è attivata si verifica il rilascio del Cytocromo c dal mitocondrio al citoplasma. Questo evento poi genera l'attivazione della caspasi 9. Per tale motivo come riscontro dell'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi si è deciso di verificare l'espressione della caspasi 9.

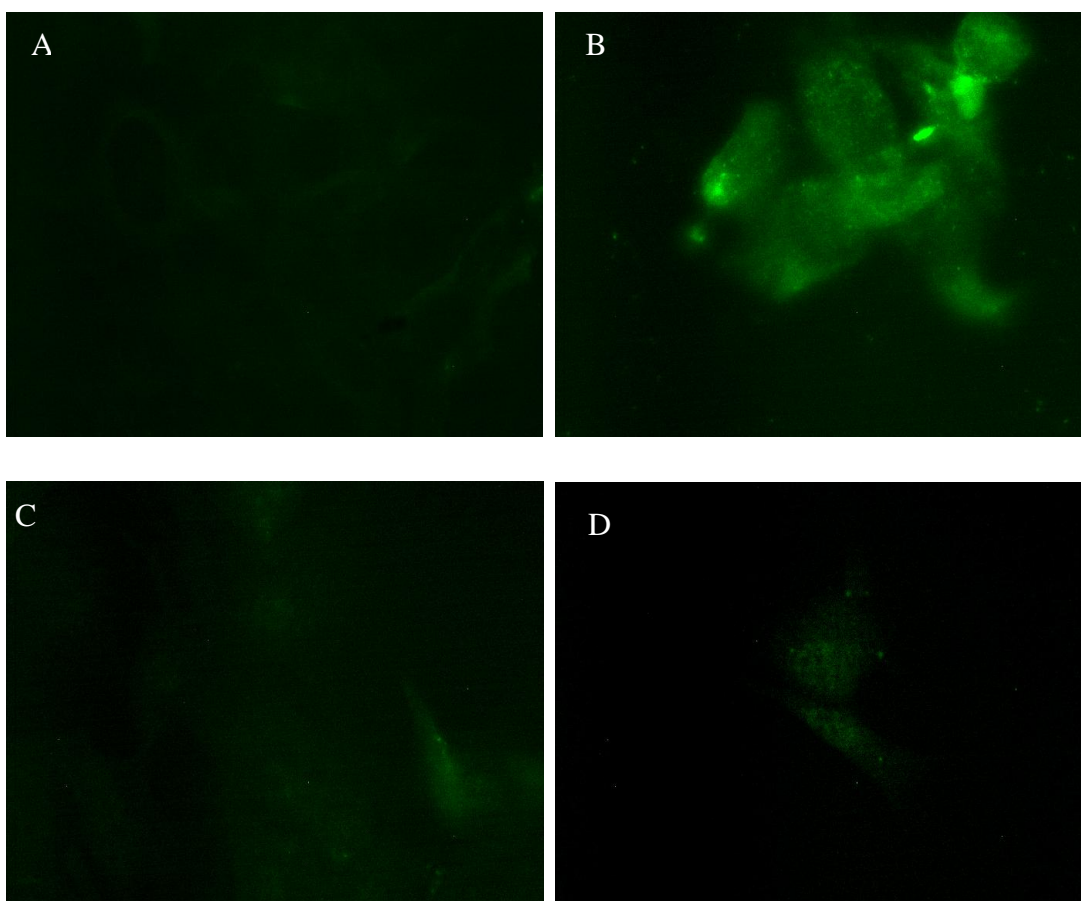


Fig.37 espressione della Caspasi 9 (in verde) dopo 48 ore di trattamento con il cisplatino. A: campione non trattato; B: Cisplatino 25 $\mu$ M, C: Dexametasone 100nM + Cisplatino 25 $\mu$ M, D: Dexametasone 100 nM.

Come si può notare in figura 37 solo nel campione trattato con il Cisplatino (Fig 37-B) si ha una forte espressione della caspasi 9, mentre negli altri campioni è assente (Fig 37-A, C, D). Questo risultato indica che il Cisplatino ha attivato l'apoptosi e che il Dexametasone in co-trattamento è stato in grado di proteggere le cellule dalla'azione citotossica del Cisplatino.

Da notare che nei campioni dove il Dexametasone è stato somministrato da solo non vi è l'espressione di nessun marker apoptotico, ciò sta ad indicare che non genera apoptosi nelle cellule a nessuna concentrazione e a nessun tempo di incubazione.



## **3.2. L'EFFETTO PROTETTIVO *IN VIVO* DEL DEXAMETASONE RISPETTO AL CISPLATINO**

### **3.2.1 INDAGINE MORFOLOGICA: MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE (SEM).**

Dopo il trattamento con il Dexametasone e il Cisplatino, mediante il microscopio elettronico a scansione, si è potuto valutare lo stato delle cellule cigliate e in particolare delle ciglia dell'Organo del Corti.

Le immagini riportate in figura 38 sono state ottenute ad alto ingrandimento e permettono di mostrare in dettaglio le ciglia e le cellule cigliate dell'Organo del Corti.

Come si può vedere il campione NT (Fig 38-A) mostra la struttura cocleare in buon assetto in cui si possono riconoscere le componenti cellulari fondamentali. Dai dati ottenuti si può vedere che anche nei campioni trattati solo con il Dexametasone (Fig 38-C) sia le cellule cigliate che le ciglia sono in buono stato. Le ciglia mostrano un normale assetto e una regolare organizzazione. Questo indica che il Dexametasone non è tossico per le cellule dell'Organo di Corti

Nel campione trattato con il Cisplatino (Fig 38-B), invece, si nota la perdita di alcune cellule cigliate sull'epitelio cocleare e le ciglia hanno perso la loro normale organizzazione e il normale assetto. Si è visto infatti che esse hanno generato dei ponti con le ciglia delle cellule adiacenti e mostrano anche un accorciamento della loro lunghezza. Si può sostenere che il Cisplatino danneggia non solo le ciglia, ma anche le cellule cigliate.

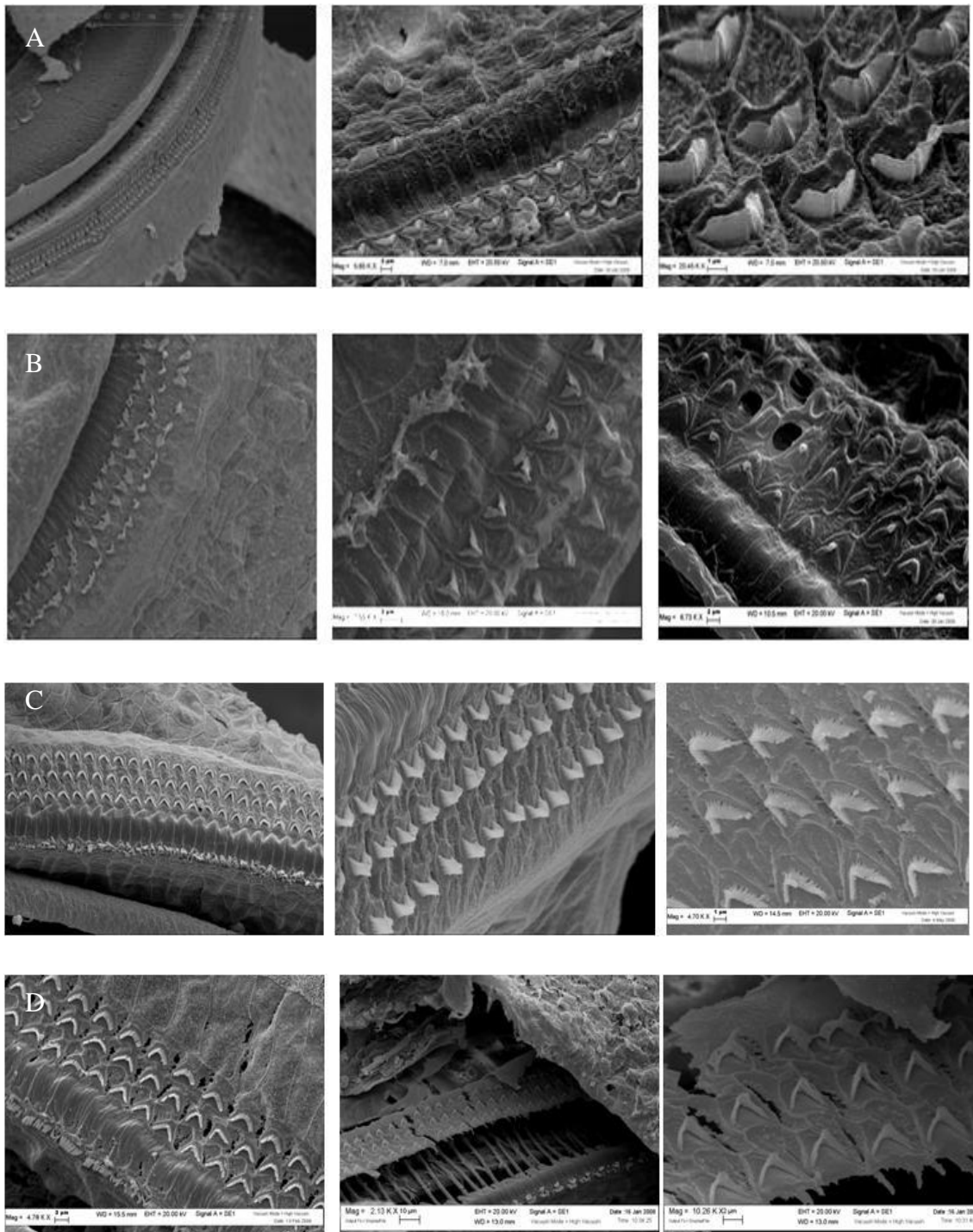


Fig 38 Immagini del SEM sullo stato di salute delle ciglia e delle cellule cigliate. A: NT, B: Cisplatino, C: Dexametasone, D: Dexametasone + Cisplatino

Infine nel campione trattato con il Dexametasone e il Cisplatino (Fig 38-D) si nota che la situazione è notevolmente migliore rispetto al campione con solo il chemioterapico, infatti non si notano perdite delle cellule cigliate. Si può vedere però che le ciglia presentano un cambiamento nell'organizzazione in quanto sono più corte e sono fuse tra loro. Si può

però dire che il Dexametasone è stato in grado di proteggere, anche se solo in parte, l'epitelio cocleare dall'azione ototossica del Cisplatino.

### 3.2.2 STUDIO DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER STRUTTURALI E DEI PATHWAYS APOPTOTICI

Anche nel caso degli esperimenti *in vivo*, mediante la tecnica dell'immunoistochimica, si è deciso di verificare in primis l'espressione dei marker strutturali dei tessuti cocleari, poi si è voluto indagare l'espressione del recettore dei glucocorticoidi e di alcune proteine indicatrici del processo apoptotico.

Le immagini riportate nelle figure 39, 40, 41, 42 mostrano rispettivamente l'espressione dei marker strutturali Miosina VIIA e Neurofilamento 200, del recettore del glucocorticoide e del marcatore apoptotico Citocromo c .

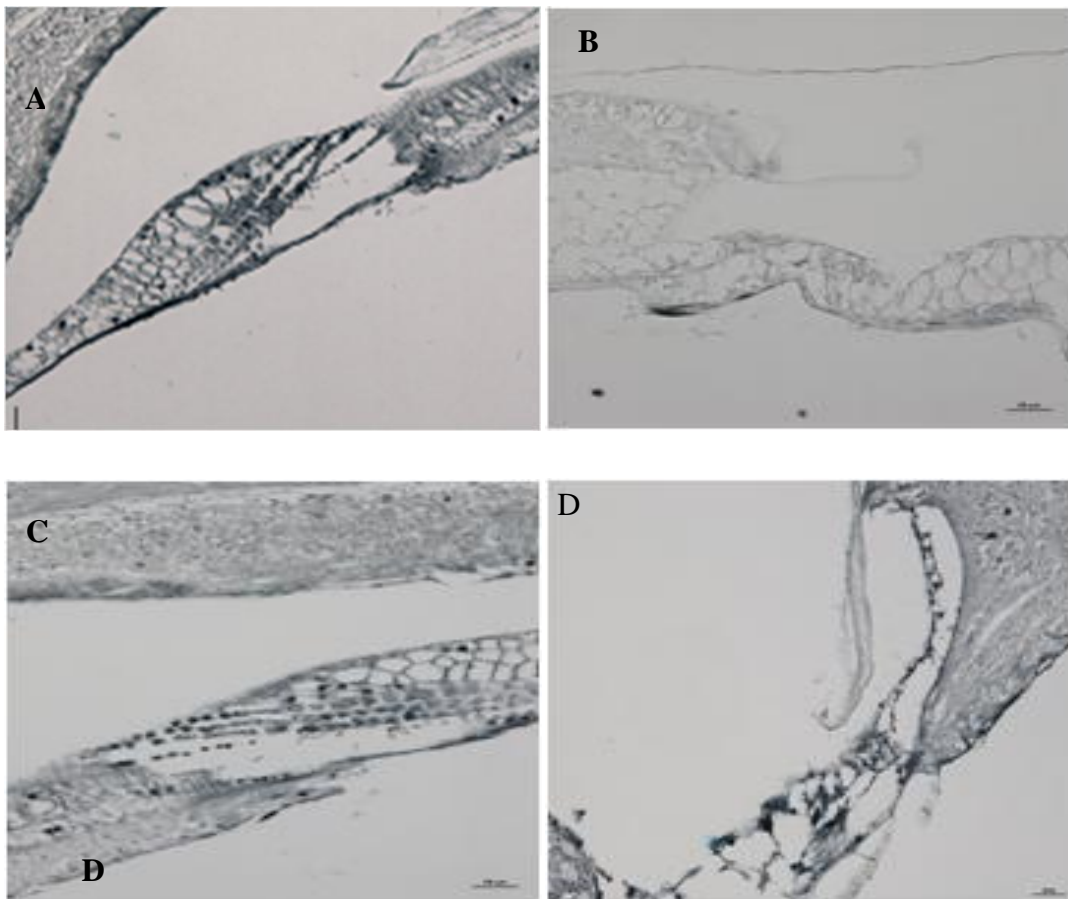


Fig 39 immagini relative all' espressione del marker strutturale Myosina VIIA nell' Organo del Corti. A: NT, B: Cisplatino, C: Dexametasone, D: Dexametasone + Cisplatino.

Come si può vedere in figura 39 la Myosina VIIA non è espressa nel campione trattato con solo Cisplatino (Fig 39-B) perché le cellule cigliate sono completamente compromesse dall'azione ototossica del farmaco. Negli altri campioni (non trattato (Fig 39-A), Dexametasone (Fig 39-D) e Dexametasone+ Cisplatino (Fig 39-C) si nota invece una buona espressione di tale proteina. Questo può indicare che il Dexametasone da solo non danneggia la struttura delle cellule cigliate e che somministrato prima del Cisplatino è stato capace di proteggere tali cellule dall'azione ototossica dell'antineoplastico.

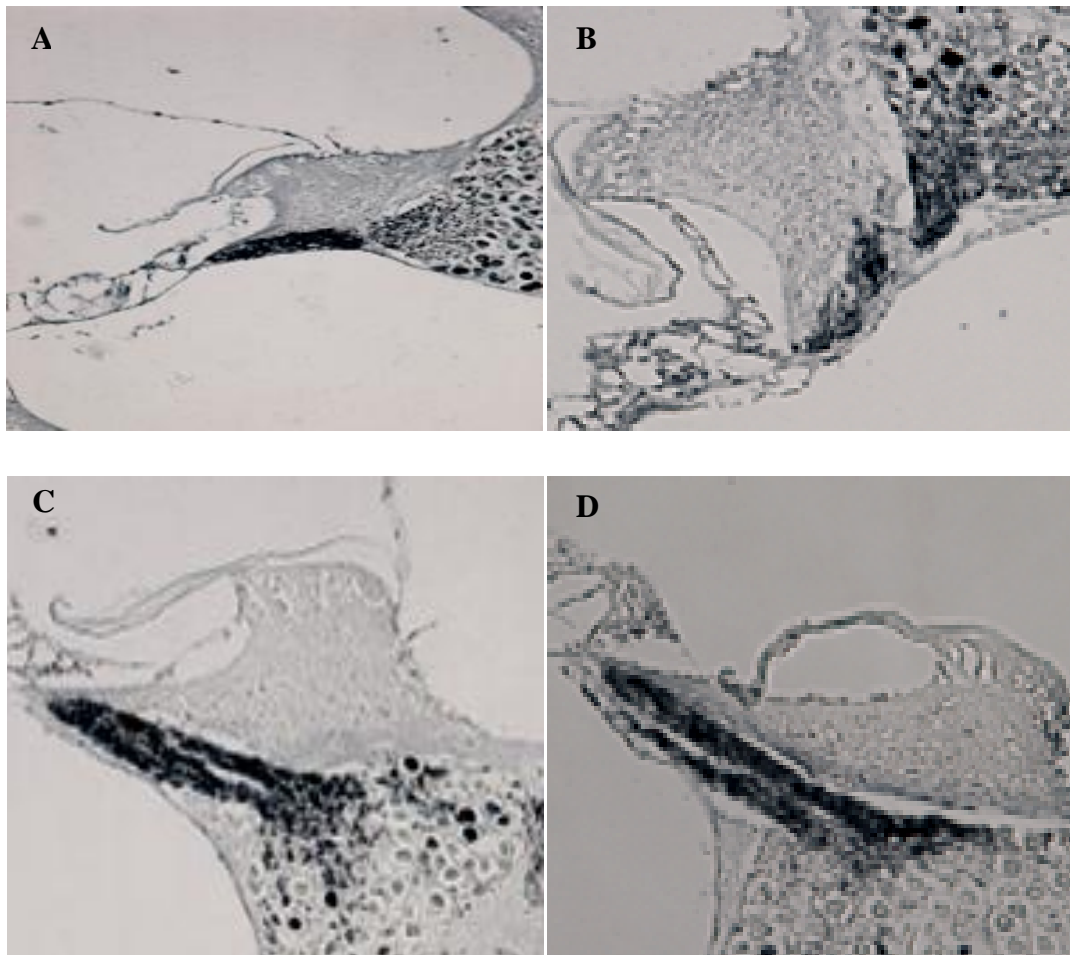


Fig.40 immagini relative all' espressione del marker strutturale Neurofilamneto 200 (NF200) a livello dell' Organo del Corti. A: NT, B: Cisplatino, C: Dexametasone, D: Dexametasone+ Cisplatino.

Come si può vedere dalle immagini nel campione Cisplatino (Fig 40-B) il neurofilamento 200 si esprime con minore marcatura rispetto agli altri campioni, ciò potrebbe indicare che è stata compromessa la struttura dei filamenti dei neuroni del ganglio spirale.

Nei campioni NT (Fig 40-A), Dexametasone (Fig 40-C) e Dexametasone+Cisplatino (Fig 40-D) si ha una notevole espressione del NF200, perché la struttura dei filamenti dei neuroni del ganglio spirale sono integri e non presentano alterazioni. Ciò sta ad indicare che il Dexametasone da solo non esplica azioni tossiche in queste strutture e che somministrato prima del Cisplatino ha un'azione protettiva.

Come si può vedere dalle immagini nel campione NT (Fig 41-A) e Dexametasone (Fig 41-C) il Recettore dei Glucocorticoidi non viene espresso, ciò potrebbe indicare che in assenza di processo infiammatorio tale molecola non si esprime. Il Dexametasone viene assimilato in tempi brevi e in assenza di danno viene smaltito dall'organismo.

Nel campione Cisplatino (Fig 41-B) e Dexametasone+Cisplatino (Fig 41-D), invece, si nota una buona espressione del Recettore che potrebbe essere dovuta al processo infiammatorio indotto dal Cisplatino.

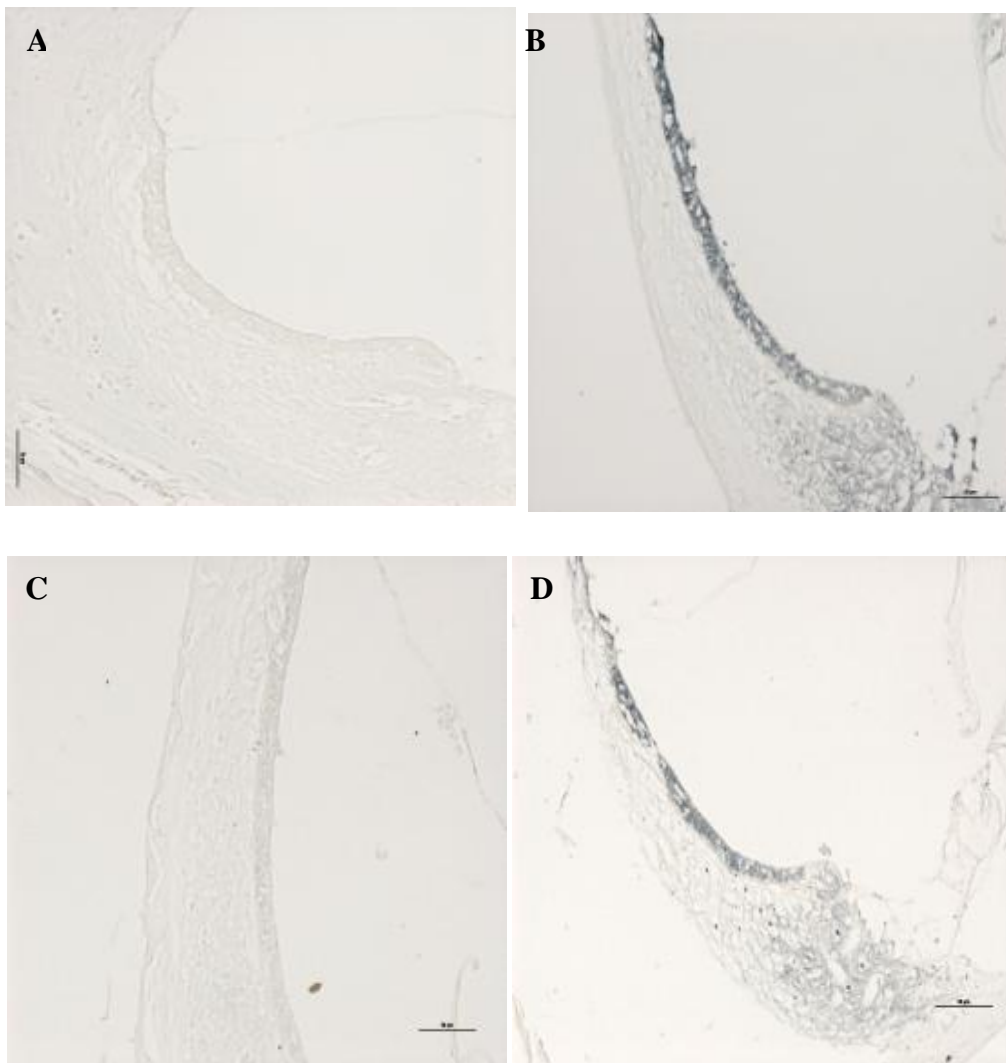


Fig 41 immagini relative all' espressione del Recettore dei Glucocorticoidi a livello della stria vascolare. A: NT, B: Cisplatino, C: Dexametasone, D: Dexametasone + Cisplatino

Come si può notare dalle immagini nel campione trattato con il Cisplatino (Fig 42-B) la marcatura è molto accentuata ed è estesa in tutto il citoplasma. Ciò si verifica quando il Citocromo c viene rilasciato nel citoplasma ad indicare che il processo apoptotico è ormai avviato. I campioni NT (Fig 42-A) e Dexametasone (Fig 42-C) mostrano una marcatura appena accennata, puntiforme in quanto il Citocromo c è localizzato all'interno dei mitocondri. Questo indica che il Dexametasone da solo non è tossico per i tessuti cocleari.

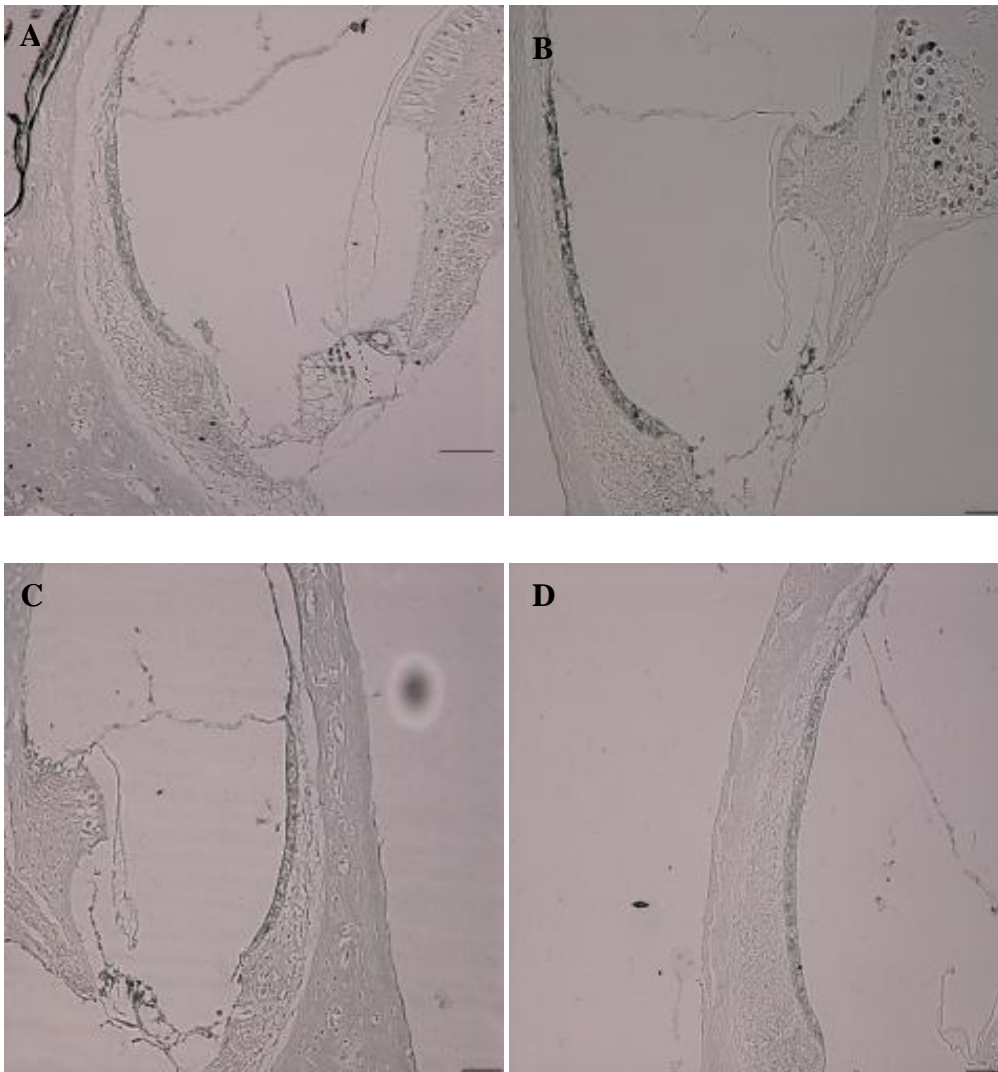


Fig.42 immagini relative all' espressione del marker apoptotico Cytocromo c a livello della stria vascolare. A: NT, B: Cisplatino, C: Dexametasone, D: Dexametasone + Cisplatino

In fine nel campione Dexametasone + Cisplatino (Fig 42-D) la marcatura è puntiforme e limitata ai mitocondri ad indicare che il Dexametasone ha espletato un'azione protettiva.



### **3.3 MESSA A PUNTO DEL SISTEMA DI TRASFEZIONE NON VIRALE**

Le Human Fetal Auditory Stem Cells (hFASC) sono state modificate geneticamente con un nuovo sistema di trasfezione non virale. Questo sistema prevede l'utilizzo di due plasmidi SB100 e pT2/Venus che derivano dall'elemento trasponibile *Sleeping Beauty*.

Come primo approccio è stato ottimizzato il protocollo di trasfezione verificando la tolleranza del dosaggio dei vettori non virali da parte delle hFASC, in un secondo momento è stato verificato se l'inserzione dei geni possa aver alterato lo stato indifferenziato delle cellule, in fine è stata verificata la capacità delle cellule trasfettate di differenziale sia in neuroni bipolari che in cellule simili alle cellule cigliate.

#### **3.3.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO DI TRASFEZIONE**

Per verificarne la tossicità e l'efficienza di trasfezione si è deciso di utilizzare differenti concentrazioni di SB100 e pT2/Venus per 16 giorni di incubazione.

Nei seguenti grafici sono riportate le percentuali di vitalità cellulare (tossicità) (Fig 43) e di efficienza di trasfezione (Fig 44) ottenute mantenendo costante la concentrazione di pT2/Venus (500ng) e cambiando le concentrazioni di SB100.

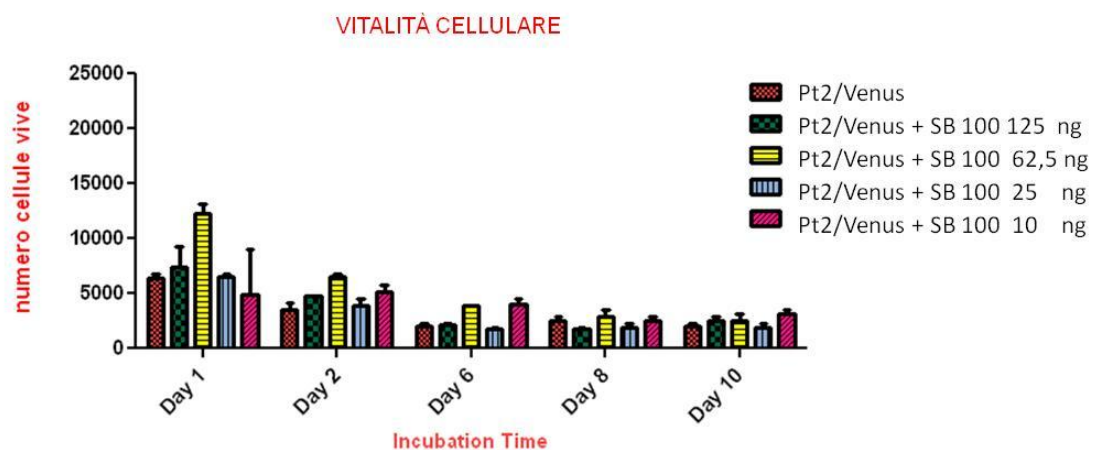


Fig 43 Vitalità cellulare (tossicità); in ordinata è riportato il numero di cellule vive, in ascissa è riportato il tempo di incubazione.

Come si può vedere nel grafico riportato in figura 43 il numero di cellule decade molto velocemente in modo tempo e concentrazione dipendente. Quindi tali concentrazioni di plasmidi generano sempre tossicità alle cellule staminali e la situazione migliore è rappresentata dal campione trattato con la più bassa concentrazione di SB 100 (10ng).

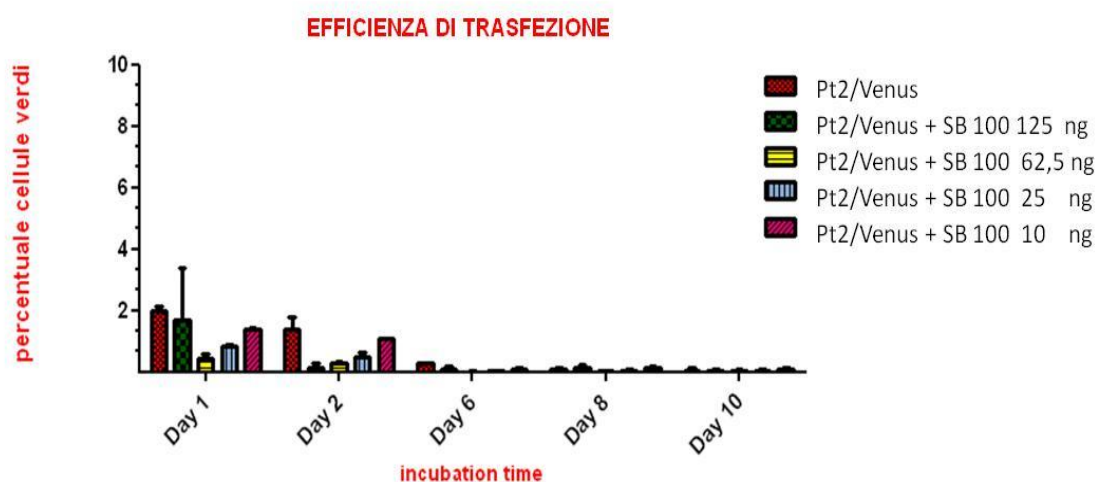


Fig 44 Grafico della efficienza di trasfezione; in ordinata è riportata la percentuale di cellule che esprimono il gene Venus , in ascissa è riportato il tempo di incubazione.

Come si può vedere dal grafico riportato in figura 44 il numero di cellule verdi trasfettate con solo pT2/venus(dove il gene Venus è una variante della Green Fluorescence Protein), decade molto velocemente nel tempo, in quanto non si ha una trasfezione stabile.

Nei campioni in co-trattamento il numero decade perché alte concentrazioni di plasmidi sono altamente tossiche per le cellule staminali. La condizione migliore si verifica quando si utilizza la più bassa concentrazione di SB100 (10ng).

Per tale motivo si è deciso di mantenere costante la concentrazione di SB100 a 10 ng e di abbassare la concentrazione di pT2/Venus.

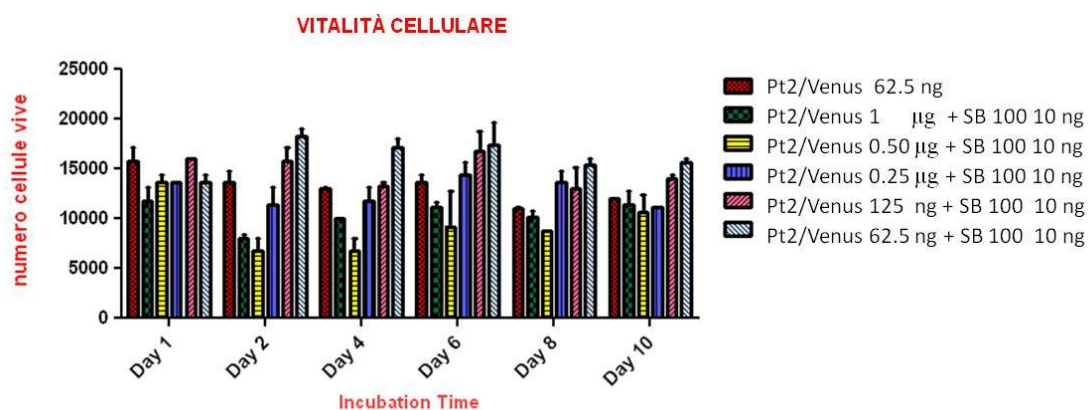


Fig 45 Vitalità cellulare (tossicità); in ordinata è riportato il numero di cellule vive, in ascissa è riportato il tempo di incubazione.

Come si può notare dal grafico riportato in figura 45 al diminuire della concentrazione di pT2/Venus la mortalità cellulare diminuisce drasticamente, quindi al contrario dei dati ottenuti alle più alte dosi dei vettori (Fig 43), non si ha più una grave tossicità tempo e dose dipendente.

La migliore condizione anche in questo caso si ottiene dalle minori concentrazioni testate, ovvero è data da SB100 10ng+pT2/Venus 62.5ng.

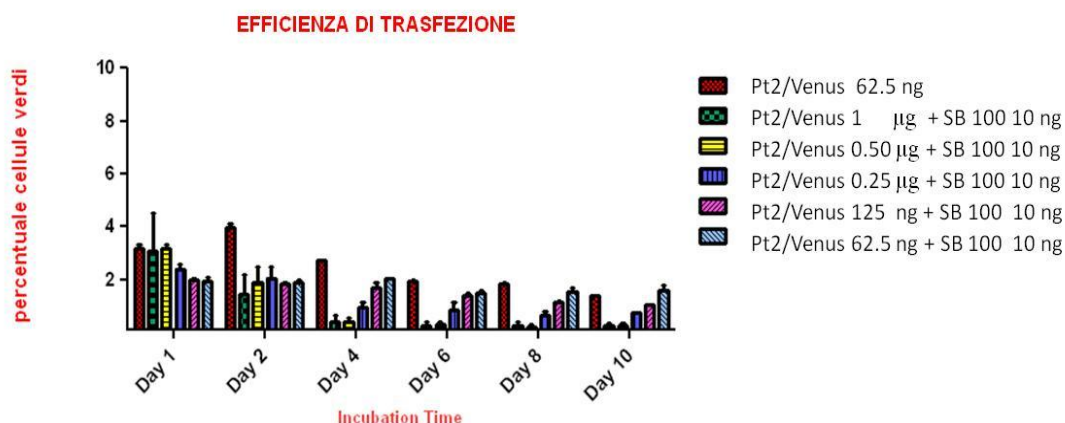


Fig 46 Grafico della efficienza di trasfezione; in ordinata è riportata la percentuale di cellule che esprimono il gene Venus, in ascissa è riportato il tempo di incubazione

Come si può notare dal grafico in figura 46 nel campione con solo pT2/Venus il numero di cellule verdi decade nel tempo in quanto non si ha una trasfezione stabile. Diminuendo la concentrazione dei plasmidi in cotrattamento, invece, il numero di cellule fluorescenti risulta maggiore rispetto ai risultati riportati nel grafico in figura 44, per via della diminuzione delle dosi e quindi della tossicità. La migliore condizione per avere la massima efficienza di trasfezione è data, anche in questo caso, dal campione trattato con le concentrazioni più basse dei plasmidi, ovvero con SB100 10 ng+ pT2/Venus 62.5 ng.

### 3.3.2 VERIFICA DELL'ESPRESSIONE DEI MARKER DELLE CELLULE STAMINALI INDIFERENZIATE

Si è voluto verificare se l'inserzione del gene ha modificato l'espressione genica dello stato indifferenziato delle hFASC. Per tale motivo si è deciso di valutare l'espressione dei tipici marker delle cellule staminali indifferenziate quali SOX2, PAX2, OCT4.

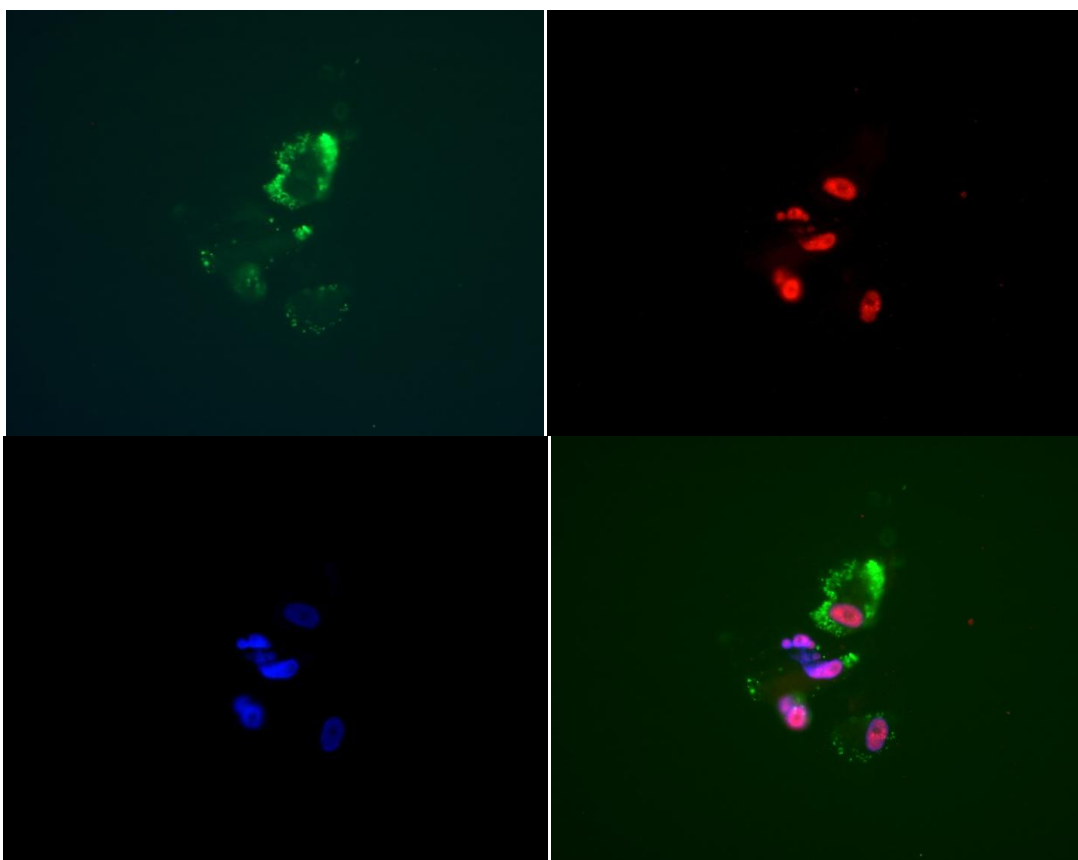


Fig 47 Espressione di SOX2 in hFASC post-trasfezione. A: fluorescenza verde data dalla proteina GFP, B: fluorescenza rossa che identifica l'espressione del gene SOX2, C: fluorescenza blu data dal DAPI D: color combine delle tre fluorescenze.

Come si può vedere dall'immagine in figura 47 le cellule che esprimono il gene della GFP ( e quindi trasfettate stabilmente) sono ancora in grado di

esprimere SOX 2, ciò sta ad indicare che l'inserzione del gene non ha compromesso l'espressione di questa proteina.

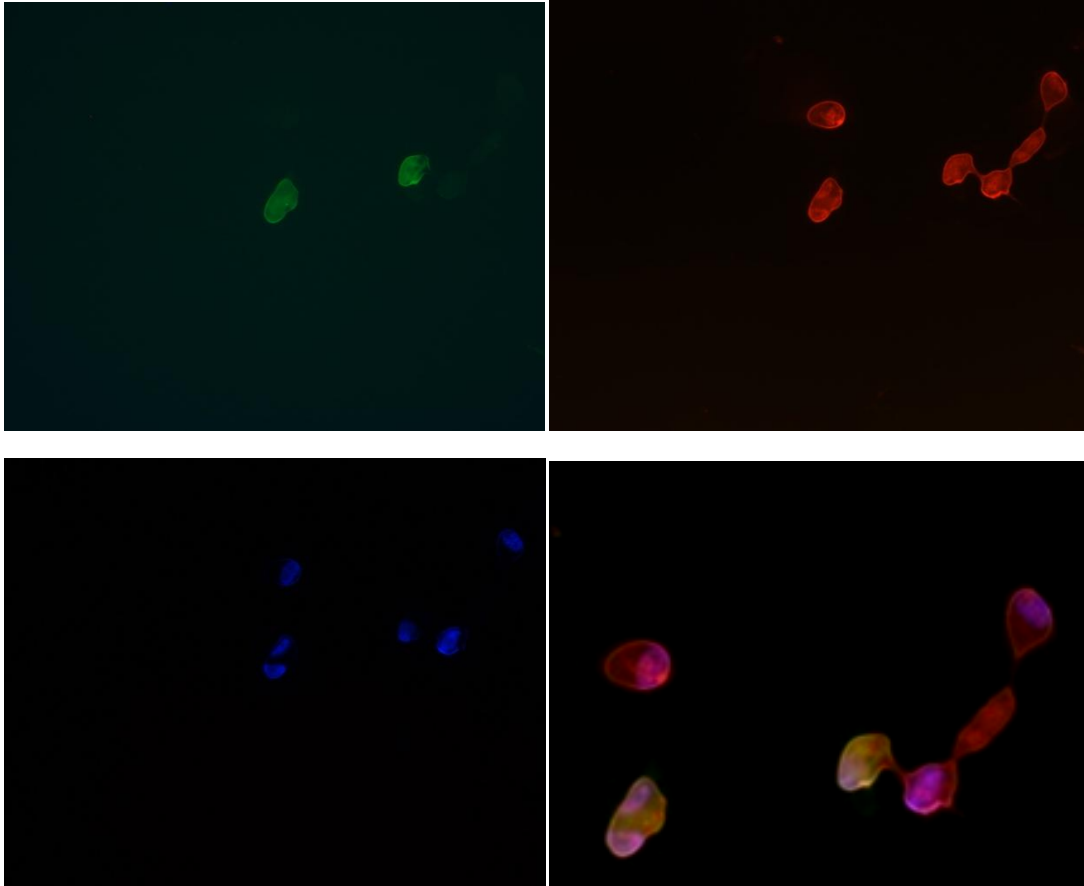


Fig 48 Espressione di PAX2 in hFASC post-trasfezione. A: fluorescenza verde data dalla proteina GFP, B: fluorescenza rossa che identifica l'espressione del gene PAX2, C: fluorescenza blu è data dal DAPI.

Come si può vedere dall'immagine in figura 48 le cellule che esprimono il gene della GFP ( e quindi trasfettate stabilmente) sono ancora in grado di esprimere anche il gene PAX 2. Quindi l'inserzione del gene non ha compromesso anche l'espressione di questa proteina.

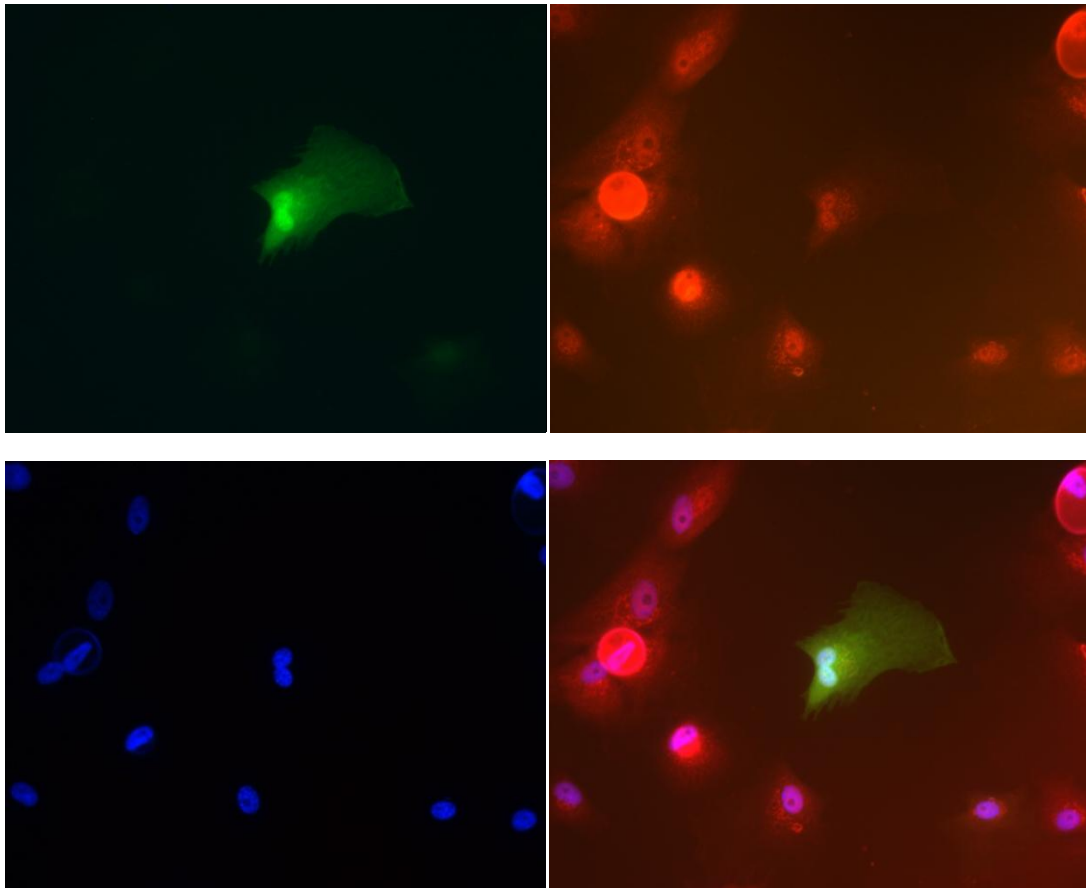


Fig 49 Espressione di OCT4 in hFASC post-trasfezione. A: fluorescenza verde data dalla proteina GFP, B: fluorescenza rossa che identifica l'espressione del gene OCT4, C: fluorescenza blu è data dal DAPI.

Come si può vedere dall'immagine in figura 47 le cellule che esprimono il gene della GFP ( e quindi trasfettate stabilmente) sono ancora in grado di esprimere OCT 4, ciò sta ad indicare che l'inserzione del gene non ha compromesso l'espressione di questa proteina. Come si può vedere dall'immagine riportata in fig49 le cellule sono ancora in grado di di esprimere anche OCT4.

### 3.3.3 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC TRASFETTATE IN NEURONI BIPOLARI E CELLULE SIMILI ALLE CELLULE STAMINALI

Un'ulteriore verifica della compatibilità del complesso di trasfezione con la funzionalità delle cellule staminali è stata analizzata, verificando la non compromissione della capacità delle hFASC di differenziare in neuroni bipolari e in cellule simili alle cellule cigliate.

Il primo passo è stato quello di verificare l'efficienza di trasfezione dei vettori non virali alle concentrazioni dei plasmidi risultate migliori dagli esperimenti precedenti (Pt2/venus 62.5 ng/ml e SB 100 10ng/ml). In seguito dal pool di cellule fetali contenente le hFASC sono state selezionate le sole cellule staminali. La popolazione isolata è stata poi trattata con gli agenti differenziativi.

#### 3.3.3.1 EFFICIENZA DI TRASFEZIONE DELLE hFASC UTILIZZANDO LA MIGLIORE CONCENTRAZIONE DI PLASMIDI

Nei grafici delle figure 50 e 51 sono rispettivamente riportate la vitalità cellulare (tossicità) e l'efficienza di trasfezione ottenute utilizzando la migliore concentrazione di plasmidi.

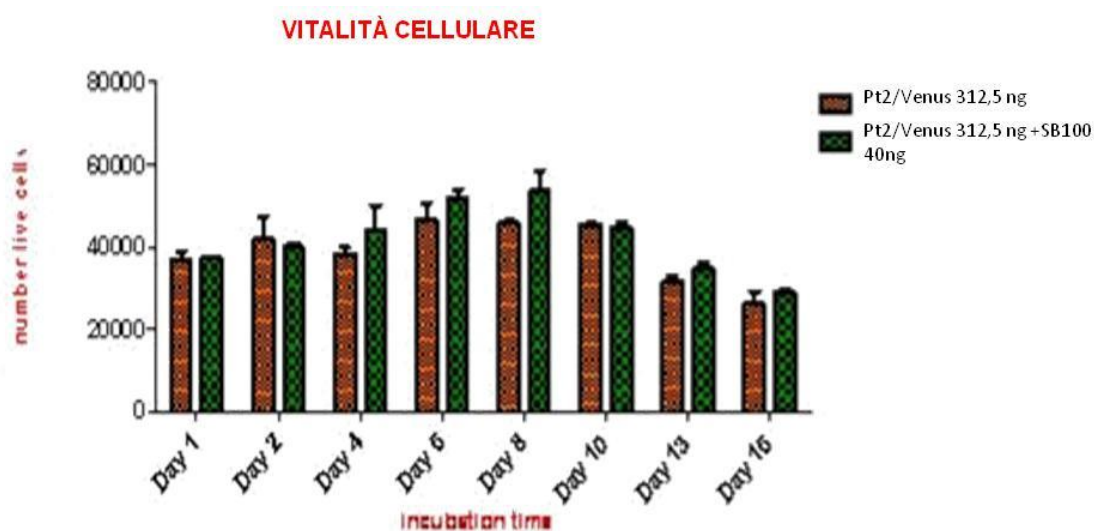




Fig 50 Vitalità cellulare (tossicità); in ordinata è riportato il numero di cellule vive, in ascissa è riportato il tempo di incubazione.

Come si può notare dal grafico riportato in figura 50 il numero di cellule vive è rimasto costante nel tempo, ciò indica che queste concentrazioni di plasmidi non sono tossiche per le hFASC. Si può anche notare che dopo 13 giorni di incubazione c'è un lieve calo di vitalità, ma è dovuto alla eccessiva crescita cellulare *in vitro*.

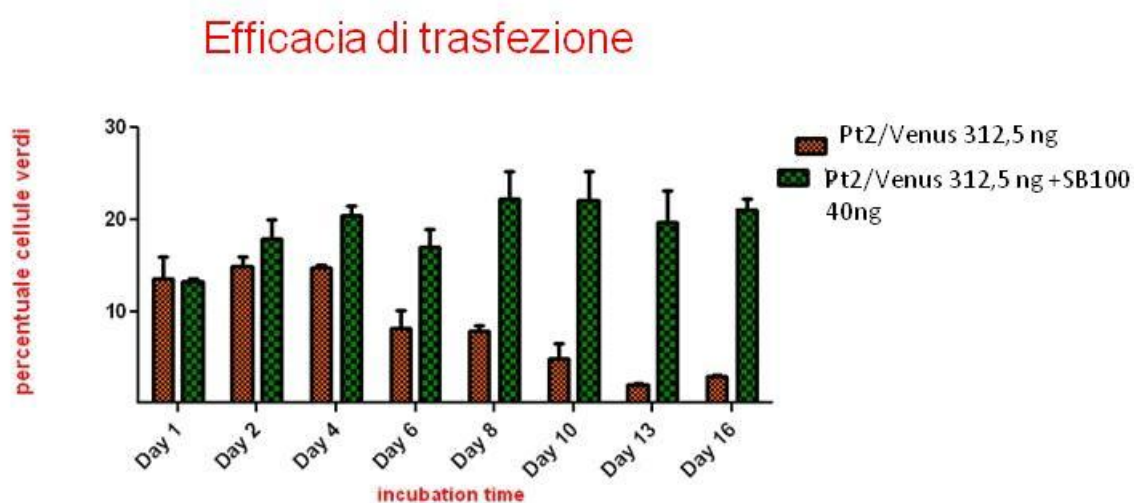


Fig 51 Grafico della efficienza di trasfezione; in ordinata è riportata la percentuale di cellule che esprimono il gene Venus , in ascissa è riportato il tempo di incubazione

Si può notare nel grafico riportato in figura 51 come il numero di cellule verdi nel campione pT2/Venus nel tempo decada velocemente in quanto non vi è una trasfezione stabile. Per quanto riguarda il campione SB100+pT2/Venus il numero di cellule trasfettate rimane stabile nel tempo, anche se si può notare un picco all' ottavo-decimo giorno di incubazione.

### 3.3.3.2 SELEZIONE DELLE hFASC

Le hFASC dopo essere state trasfettate con le migliori concentrazioni di plasmidi (pT2/Venus 312,5 ng+SB100 40 ng) sono state selezionate per ottenere in coltura le sole cellule staminali.

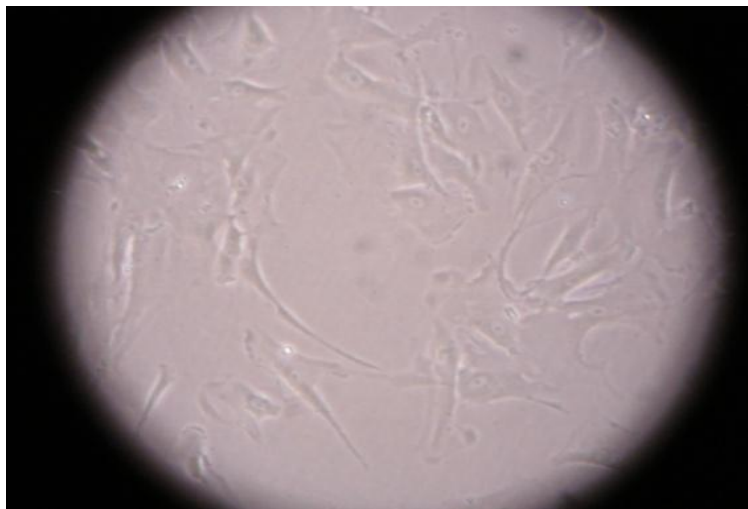


Fig 52 immagine delle hFASC prima della selezione

Come si vede in figura 52 il pool di cellule non ancora selezionato ha una morfologia allungata con il nucleo centrale di colore chiaro. In questo pool vi sono diverse popolazioni di cellule oltre a quelle staminali.

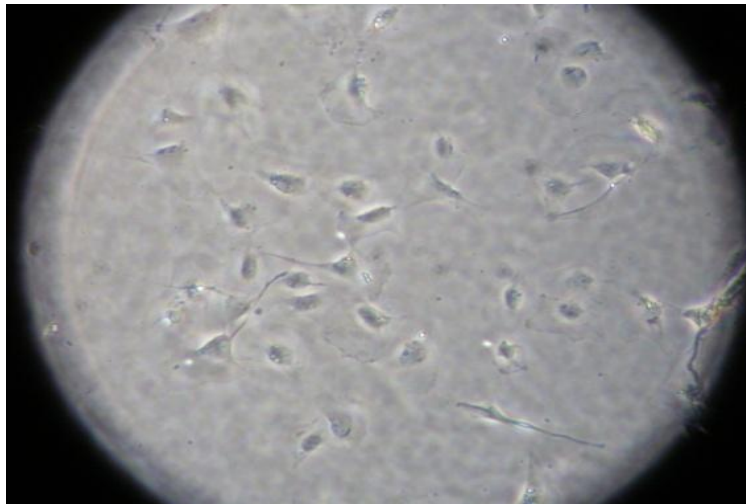


Fig 53 immagine della hFASC dopo la selezione

Dopo la selezione si riconoscono le sole cellule staminali poichè appaiono rotondeggianti e con un nucleo di colore scuro (Fig 53).

Analizzando il campione a fluorescenza si possono ancora notare cellule verdi (trasfettate stabilmente), a conferma del fatto che il sistema non virale ha permesso l'ingegnerizzazione molecolare delle cellule staminali.

### 3.3.3.3 DIFFERENZIAMENTO DELLE hFASC IN CELLULE SIMILI ALLE CELLULE CIGLIATE E IN NEURONI BIPOLARI

In seguito alla trasfezione e la selezione si è voluto verificare se le hFASC erano ancora in grado di differenziare in cellule simili alle cellule cigliate o in neuroni bipolari, quando sottoposte a particolari trattamenti.

Solo dopo 15 giorni di “trattamento differenziativo” è possibile evidenziare l’espressione dei marker tipici delle cellule cigliate (MATH1, BRN3 C) o dei neuroni bipolari (TUJ1, BRN3A).

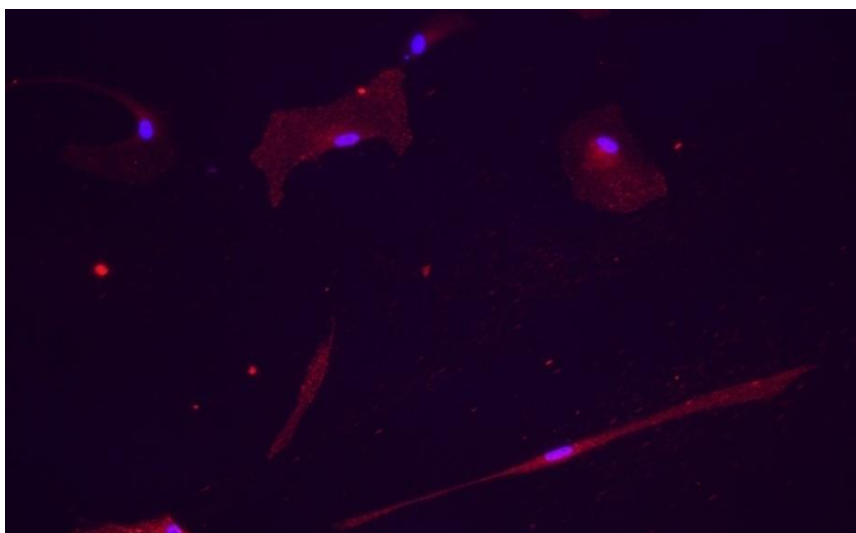


Fig 54 immagine dell’espressione del marker delle cellule cigliate MATH1

In figura 54 è riportata la foto a fluorescenza di hFASC dopo i 15 giorni di trattamento, come si può notare esse esprimono il marker MATH1. Le cellule che però esprimono questo marker sono cellule che sono state selezionate, ma non trasfettate perché non esprimono la GFP. L’ unica cellula trasfettata non esprimeva questo marker.

Non è stata riportata in questa sede la differenziazione in neuroni bipolari in quanto vi sono stati problemi tecnici durante gli esperimenti, che non

hanno permesso la conclusione degli stessi. Sono quindi ancora in corso gli esperimenti relativi a questo tipo di indagine.

## **4 DISCUSSIONE**

Da letteratura si sa che il Cisplatino è un agente chemioterapico utilizzato per il trattamento di moltissimi tipi di tumori solidi (Trimmer and Essigmann., 1999; Cohen and Lippard., 2001). Uno dei fattori limitanti nell'utilizzo clinico di questa sostanza è il dosaggio (Vermorken et al., 1983; Safirstein et al., 1986; Blakely et al., 1994) infatti tale sostanza genera molti effetti collaterali tra cui l'ototossicità che si manifesta con tinnito, perdita di udito alle alte frequenze e sordità. I tessuti neurosensoriali dell'orecchio interno, però, non sono in grado di rigenerarsi una volta danneggiate, per questo si stanno studiando farmaci con azioni protettive e metodi di terapia genica per ripristinare i danni uditivi.

### **4.1 EFFETTO PROTETTIVO DEL DEXAMETASONE RISPETTO ALLA TOSSICITA' DEL CISPLATINO NEL MODELLO *IN VITRO***

Nei campioni trattati con il Cisplatino a differenti concentrazioni (13-25  $\mu$ M) dalle 24h alle 72h di trattamento si vede che la percentuale di mortalità va dal 17% al 45%, inoltre, dai dati ottenuti si è visto che le due differenti concentrazioni generano la stessa percentuale di mortalità.

Ciò dimostra che la tossicità del Cisplatino non è concentrazione dipendente, ma è tempo dipendente. I dati ottenuti però non concordano con i dati ottenuti da altri gruppi, i quali sostengono che la tossicità del Cisplatino sia concentrazione dipendente. Bertolaso (Bertolaso., 2001) e Previati (Previati, 2007) hanno usato le OC-k3 e hanno dimostrato che la tossicità del Cisplatino è concentrazione/tempo dipendente. Esperimenti eseguiti su altre linee cellulari, quali Capozzi che ha utilizzato le cellule di linfoma TLX5, Maldonado che ha usato le cellule Hela e Liu che ha utilizzato le cellule di tumore alla vescica RT112, TCCSUP, dimostrano

che la tossicità del Cisplatino è concentrazione dipendente (Maldonado., 1997; Capozzi., 1998; Liu et al., 2008). Probabilmente la discrepanza dei risultati sta nel fatto che hanno usato diverse concentrazioni del farmaco ampliando il range delle dosi.

Per quanto riguarda lo stato del citoscheletro dopo 24 h di trattamento con il Cisplatino sembra non essere danneggiato. Questo dato è confermato anche dal lavoro svolto da Evans (Evans et al., 1998), in cui il citoscheletro non è danneggiato dal cisplatino nei tempi brevi. A tempi più lunghi (dopo 48 h), invece i campioni trattati con il Cisplatino mostrano fortissime alterazioni, i filamenti sono assottigliati e in alcune parti sono evidenti anche delle rotture. Questo dato è confermato dal lavoro di Previati (Previati., 2007), nel quale viene indicato che il Cisplatino altera il citoscheletro dopo 48h dal trattamento.

Per quanto riguarda lo stato dei nuclei (condensazione della cromatina) i campioni trattati con il Cisplatino non mostrano frammentazione della cromatina sia alle 24h sia alle 48 h. Anche in questo caso i dati ottenuti dal dal gruppo di Previati (Previati., 2007) concordano con quelli della presente tesi.

Dopo aver verificato la tossicità e la morfologia del citoscheletro mediante la tecnica dell'immunocitochimica è stato verificato l'effetto apoptotico indotto dal Cisplatino, tramite l'espressione dei marker tipici di questo processo.

Dai dati ottenuti si può notare che il Cisplatino (13 e 25  $\mu$ M) attiva il processo apoptotico per via intrinseca in quanto si vede l'espressione del Citocromo c a livello citosolitico e della caspasi 9. Quest'ultima viene attivata quando il Citocromo c viene rilasciato dal mitocondrio al citoplasma. Questi dati concordano con quelli ottenuti da Henkels (Henkeles et al., 1999), che sostiene che il Cisplatino attiva l'apoptosi nelle

linee cellulari CP730 e C30 per via intrinseca, in quanto anch'esso ha ottenuto un'espressione molto marcata del Cytocromo c nel citoplasma e della caspasi 9. Dai dati ottenuti in questa serie di esperimenti, sia sul modello *in vivo* sia *in vitro*, non è stata mai evidenziata l'espressione dei marcatori apoptotici della via estrinseca. Tuttavia Devarajan (Devarajan et al., 2002) e Park (Park et al., 2009) sostengono che il Cisplatino attiva il processo apoptotico in cellule uditive (HEI-OC) sia per la via estrinseca (attivazione della caspasi 8, 3) sia per la via intrinseca (attivazione della caspasi 9, 3).

Come è stato detto in precedenza il Cisplatino è in grado di generare molti effetti collaterali tra cui l' ototossicità. Attraverso molti studi si è visto che esistono molti agenti antiossidanti chemioprotettivi che sono in grado di migliorare l'ototossicità indotta dal Cisplatino. Il Dexametasone è uno dei più potenti agenti glucocorticoidi che viene generalmente utilizzato per contrastare i processi infiammatori (Chrousos, 1995). Esso è solito essere usato per il trattamento della malattia di Mènière, per l'ototossicità indotta dai silicati e dagli amino glicosidi (Silverstein et al., 1996; Chandrasekhar et al., 2001; Himeno et al., 2002).

I dati ottenuti indicano che il Dexametasone non è tossico e che è anche in grado di proteggere le cellule dai danni prodotti dal Cisplatino. Diversi studi hanno confermato che il Dexametasone è in grado di ridurre gli effetti nocivi generati da sostanze tossiche (Cisplatino) (Ravi et al., 1995; Daldal et al., 2007).

Dopo aver dimostrato che il Dexametasone non è nocivo si è deciso di valutare la sua capacità di proteggere le strutture dell'orecchio interno dall'azione tossica del Cisplatino.

Come si nota dai dati ottenuti si può affermare che il Dexametasone, somministrato sia da solo sia in pretrattamento, a tutti i tempi di



incubazione testati non genera alterazioni del citoscheletro, infatti i filamenti risultano perfettamente organizzati, ben assemblati e il nucleo è intatto. Al contrario, il citoscheletro del campione trattato solo con il Cisplatino è completamente compromesso, mostra anche delle fratture, mentre nel campione pretrattato con il Dexametasone il citoscheletro è integro. Dunque si può affermare che il Dexametasone somministrato prima del Cisplatino è in grado di proteggere il citoscheletro dall'azione tossica dell' agente antineoplastico.

In più, è da notare che il Dexametasone non genera apoptosi nelle cellule a nessuna concentrazione e tempo di incubazione testati quando viene somministrato da solo, poiché non vi è l'espressione di alcun marker apoptotico. Nel campione solo Cisplatino, invece, l'espressione del Citocromo c è omogenea in tutto il citoplasma, a dimostrare che il processo apoptotico è avviato. Per quanto riguarda i campioni pretrattati con il Dexametasone 24 h prima rispetto al Cisplatino si può vedere come l'espressione del Citocromo c sia puntiforme, quindi l'apoptosi non è ancora attiva. Questo dimostra che il Dexametasone è stato in grado di rallentare il processo apoptotico. I dati ottenuti in questa tesi sono stati confermati da diversi studi, infatti si è visto che in cellule di osteosarcoma umano il Cisplatino induce l'apoptosi per via intrinseca in quanto si ha una espressione del Citocromo c molto marcata nel citoplasma e l'espressione della caspasi 9. Si è visto che pretrattando le cellule con il Dexametasone, esso è in grado di ridurre l'apoptosi del 10-25% (Meyer et al., 2006).

#### **4.2 EFFETTO PROTETTIVO DEL DEXAMETASONE RISPETTO ALLA TOSSICITA' DEL CISPLATINO NEL MODELLO *IN VIVO***

Studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che il Cisplatino danneggia le cellule cigliate esterne (OHC) localizzate, principalmente, nel giro basale e mediale della coclea. Talvolta, però, provoca la perdita di alcune cellule cigliate interne (Estrem et al., 1981; Laurell et al., 1991). I danni indotti dal Cisplatino, però, non sono limitati alle cellule cigliate, ma si verifica anche una degenerazione della stria vascolare (Tange et al., 1984; Tsukasaki et al., 2000) e una significativa diminuzione del numero delle cellule del ganglio spirale (Zheng et al., 1996; Gabaizadeh et al., 1992). Genera inoltre il collasso della membrana del Reissner e danni alle cellule di supporto dell'Organo del Corti (Laurell et al., 1991).

I dati ottenuti mediante il microscopio elettronico a scansione (SEM), hanno permesso di mostrare lo stato delle ciglia e delle cellule cigliate presenti sull'Organo del Corti, dopo i trattamenti con il Cisplatino.

Si può sostenere che il chemioterapico danneggia non solo le ciglia, ma anche le cellule cigliate. Infatti si è visto che le ciglia subiscono un'alterazione in quanto generano ponti con le ciglia delle cellule adiacenti, hanno perso la loro normale organizzazione e hanno subito anche un forte accorciamento. Per quanto riguarda le cellule cigliate, si è notato che vi sono dei buchi sulla membrana basilare, a indicare che il Cisplatino ha completamente distrutto queste cellule. Questi dati concordano con quelli ottenuti da Estrem (Estrem et al., 1981), Laurell (Laurell et al., 1991), Kopte (Kopte et al., 1997), Liu (Liu et al., 1998) e Rybak (Rybak et al., 1999).

Dalle analisi successive si è visto che il Cisplatino è in grado di attivare il processo apoptotico in quanto si è verificata l'espressione dei marker

apoptotici (Cytocromo c, Caspasi 3) a livello dei neuroni del ganglio spirale, della stria vascolare e dell'Organo del Corti.

Anche il pattern di espressione della caspasi 3 ottenuto in seguito al trattamento con il Cisplatino *in vivo* concorda con i dati ottenuti da Liu (Li et al., 1998); Deverajan (Deverajan et al., 2002); Kalinec (Kalinec et al., 2003).

Per quanto riguarda l'espressione citoplasmatica del Cytocromo c concorda con quella ottenuta da Tanaka e i suoi collaboratori. Esso sostiene che i tessuti trattati con il Cisplatino vanno in apoptosi e ciò si verifica con un notevole rilascio del Cytocromo c dal mitocondrio al citoplasma (Tanaka et al., 2005).

Un metodo per affrontare l'ototossicità indotta da questa sostanza è l'utilizzo di farmaci ototoprotettivi come ad esempio il Dexametasone, che può essere somministrato o per via intraperitoneale o per iniezione intratimpanica.

In questa serie di esperimenti il Dexametasone viene somministrato 48-3h prima del Cisplatino per via intraperitoneale. In letteratura vi sono dati in cui il Dexametasone è stato somministrato 30 min. prima del Cisplatino (Daldal et al., 2007) il quale ha dimostrato la capacità protettiva del glucocorticoide a livello funzionale, ovvero analizzando solo le soglie uditive senza approfondire le condizioni dei tessuti cocleari.

Dai dati ottenuti si può vedere che nei campioni trattati solo con il Dexametasone sia le cellule cigliate che le ciglia sono in buono stato. Le ciglia mostrano un normale assetto e una regolare organizzazione. Questo indica che il Dexametasone non è tossico per le cellule dell'Organo del Corti. Nei campioni pretrattati con il Dexametasone si nota che non mancano cellule cigliate e che le ciglia non hanno subito grandi alterazioni

organizzative, anche se hanno riportato un accorciamento. Se confrontiamo questi campioni con quelli trattati solo con il Cisplatino si nota come il Dexametasone sia stato in grado di proteggere, anche se solo in parte, le cellule dell'Organo del Corti dall'azione tossica dell'agente antineoplastico.

I dati ottenuti in questa tesi sono stati in parte confermati dal lavoro di Himeno (Himeno et al., 2002) il quale sostiene che il Dexametasone somministrato prima degli aminoglicosidi a livello cocleare è in grado di proteggere sia le cellule cigliate sia la funzione uditiva. In più la somministrazione diretta del Dexametasone a livello dell'orecchio interno è sicuro ed efficace (Himeno et al., 2002). Molti studi hanno confermato che l'iniezione intratimpanica di Dexametasone è in grado di minimizzare i danni indotti dal Cisplatino a livello dell'orecchio interno, in quanto previene la formazione delle specie reattive dell'azoto (NOS) (Daldal et al., 2007).

Nei campioni trattati solo con il Dexametasone si può vedere che non vi è nessuna espressione di nessun marker apoptotico. Ciò conferma che il Dexametasone non è tossico per tessuti dell'orecchio interno. Nei campioni pretrattati con il Dexametasone si può vedere che l'espressione dei marker apoptotici, come il Cytocromo c e la caspasi 3 sia molto attenuata rispetto ai campioni trattati con il Cisplatino da solo. Questo potrebbe indicare che il Dexametasone sia stato capace di rallentare e attenuare il processo apoptotico. Irazuta sostiene che il Dexametasone viene utilizzato per contrastare l'infiammazione indotta dalla meningite, grazie alla riduzione dell'espressione delle caspasi (Irazuta et al., 2005).

### **4.3 TRASFEZIONE DELLE hFASC UTILIZZANDO UN NUOVO METODO DI TRASFEZIONE NON VIRALE BASATO SULL' ELEMENTO TRASPONIBILE *SLEEPING BEAUTY***

In questa tesi viene presentato per la prima volta un protocollo per la trasfezione delle hFASC con l'elemento trasponibile *Sleeping Beauty*.

Il progetto, che è stato eseguito in collaborazione con l'Università di Sheffield, ha lo scopo di attuare un protocollo di terapia genica basato su un nuovo metodo di trasfezione non virale, che si avvale dell'utilizzo dell'elemento trasponibile *Sleeping Beauty*.

Questo elemento trasponibile *Sleeping Beauty* è stato modificato per generare due separati plasmidi uno dei quali codifica il gene per la trasposasi (SB 100) e uno che codifica il gene per la GFP compreso fra i specici IRs (pT2/Venus) (Ivics et al., 1997). Il plasmide SB100 è in grado di inserire il gene della GFP in qualsiasi parte del genoma delle cellule ospiti in maniera casuale (Ivics et al., 1997). È un sistema di trasfezione sicuro, infatti non genera risposte immunitarie e non ci sono limiti di grandezza nelle sequenze dei geni di espressione da inserire (Zayed et al., 2004).

Le hFASC sono state trasfettate con i due plasmidi sia da soli che in co-trattamento a differenti concentrazioni per valutarne la tossicità.

Come si è visto alte concentrazioni di plasmidi sono tossiche per le hFASC, infatti la vitalità cellulare decade molto rapidamente nei 10 giorni di incubazione e la migliore condizione è quando viene utilizzata la più bassa concentrazione di SB100 (10 ng). Lo stesso accade per quanto riguarda l'efficacia di trasfezione. Si è visto che il numero di cellule trasfettate nel campione trattato solo con il vettore portatore della GFP (pT2/Venus)

decade velocemente perché non si ha una trasfezione stabile. La migliore condizione è stata ottenuta utilizzando la più bassa concentrazione dei plasmidi pT2/Venus 62.5 ng e SB 100 10ng. Per quanto riguarda l'efficacia di trasfezione nei campioni trattati con tali dosi il numero di cellule verdi rimane costante nel tempo, perché danno una trasfezione stabile.

Quindi le hFASC possono essere tranquillamente trasfettate con questo nuovo metodo di trasfezione senza grossi problemi. Questi dati ottenuti sono un buon punto di partenza per attuare un protocollo di terapia genica per affrontare patologie dell'apparato uditivo.

Dunque si può affermare che questi plasmidi possono essere utilizzati in organismi vitali senza danneggiarli. La stessa conclusione è stata tratta da Yant e collaboratori in un lavoro dove i due elementi derivanti dal sistema trasponibile *Sleeping Beauty* che codificavano per il gene lacZ, sono stati iniettati nella vena della coda di un topo vivo e hanno riportato che il 5% degli epatociti esprimevano il gene per la lacZ (Yant et al., 2000). In più in un altro esperimento riportato in letteratura, questo sistema non virale è risultato efficace anche in studi di rigenerazione dell'epidermide. In particolare sono stati presi dei cheratociti derivanti dal tessuto epidermico di pazienti affetti da epidermolisi bollosa (JEB junctional epidermolysis bullosa) e sono stati trasfettati con i plasmidi (derivanti da *Sleeping Beauty*) che portano il cDNA della laminina e il gene per un particolare antibiotico (Ortiz-Urda et al., 2003). Le cellule trasfettate sono state poste in coltura con particolari agenti di selezione. Le cellule che esprimevano la laminina furono utilizzate per generare pelle umana su topi immunosoppressi. La pelle delle persone affette da JEB era stata rigenerata e le cellule ingegnerizzate mostravano una corretta espressione della (Ortiz-Urda et al., 2003).

Questi studi dimostrano che il trasferimento genico basato sull'elemento trasponibile per la manipolazione di tessuti cellulari, dalle cellule staminali a cellule epiteliali, permettono correzioni genetiche utili per applicazioni di terapia genica nella cura di diverse patologie.

## **5 CONCLUSIONI**

### **5.1 CONCLUSIONI LAVORO *IN VITRO***

Nel lavoro *in vitro* si è visto che la tossicità indotta dal Cisplatino è tempo dipendente, in quanto la mortalità cellulare aumenta nel tempo. Abbiamo verificato, che la tossicità non è concentrazione dipendente alle dosi testate, visto che non si sono evidenziate differenze significative tra le due concentrazioni. Dexametasone non è tossico a nessuna concentrazione e a nessun tempo di incubazione e quando somministrato 24h prima del Cisplatino è stato in grado di proteggere le cellule dall'azione tossica del farmaco a tutti i tempi di incubazione e a tutte le concentrazioni testate.

Questi risultati sono stati confermati anche dai dati ottenuti dall'analisi morfologica del citoscheletro e dei nuclei delle cellule. Il Dexametasone sia alle 24h sia alle 48 h non genera alterazioni nel citoscheletro e i nuclei rimangono integri. Nel caso del pretrattamento con il Dexametasone 24h prima rispetto al Cisplatino, esso è in grado di proteggere il citoscheletro dall'azione tossica del farmaco antineoplastico.

Dall'espressione dei marker apoptotici si conferma che il Cisplatino è una sostanza tossica che attiva l'apoptosi per via intrinseca. Da notare che anche da queste analisi il dexametasone risulta avere un effetto protettivo nei confronti della citotossicità del chemioterapico, infatti protegge il citoscheletro e rallenta l'insorgenza del processo apoptotico.



## 5.2 CONCLUSIONI DEL LAVORO *IN VIVO*

Nel lavoro *in vivo* si è potuto dimostrare l'effetto tossico del Cisplatino, la non nocività del Dexametasone e l'effetto protettivo di quest'ultimo contro l'azione tossica dell'agente antineoplastico.

Infatti, tramite il microscopio elettronico a scansione (SEM) si è riuscito a determinare che il Cisplatino è altamente tossico per le ciglia e per le cellule cigliate poichè distrugge le cellule cigliate, genera disorganizzazioni e accorciamento delle ciglia. Il Dexametasone, invece non risulta dannoso, e per di più è in grado di proteggere queste strutture dall'azione tossica del Cisplatino.

È stato dimostrato anche che il Cisplatino comporta l'attuazione del processo apoptotico, in quanto nei campioni trattati con questo farmaco si ha una marcata espressione dei pathways apoptotici, mentre il Dexametasone non genera alcuna tossicità. Soprattutto si può confermare che il pretrattamento con il Dexametasone è in grado di proteggere i tessuti dalla morte cellulare indotta dal Cisplatino.

Si può concludere dicendo che i risultati ottenuti dal lavoro *in vitro* e quelli del lavoro *in vivo* concordano pienamente, infatti il Cisplatino genera tossicità sia nella linea cellulare OC-k3 sia nei tessuti dell'Organo del Corti. Il Dexametasone, invece, non è tossico a nessuna concentrazione. Datopiù interessante è che il Dexametasone esplica un'azione protettrice rispetto all'azione tossica del Cisplatino sia nelle cellule OC-k3 sia nei tessuti dell'Organo del Corti.

### **5.3 CONCLUSIONI LAVORO *IN VITRO*. TRASFEZIONE DELLE hFASC CON L'ELEMENTO TRASPONIBILE *SLEEPING BEAUTY***

I dati ottenuti dallo studio dell'applicazione del sistema trasponibile non virale, sono dati preliminari, in quanto prima d'ora le hFASC non sono mai state trasfettate con il sistema di trasfezione *Sleeping Beauty*.

Si può affermare che alte concentrazioni di queste sostanze generano tossicità alle cellule infatti la vitalità cellulare decade molto velocemente. Abbassando la concentrazione dei plasmidi la vitalità cellulare si mantiene costante nel tempo di incubazione e l'efficacia di trasfezione migliora sensibilmente.

Si è determinato che l'espressione della GFP si mantiene per 90 giorni, e che l'inserzione del gene non altera l'espressione dei marcatori di stato indifferenziato delle cellule staminali.

Da questi dati si può concludere che le hFASC possono essere trasfettate con l'elemento trasponibile non virale *Sleeping Beauty* per ottenere una trasfezione a lungo termine.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

- ✓ **Alajmo, E.** 1995. Otorinolaringoiatria Otorinolaringoiatria Ed. Piccin-Nuova Libreria
- ✓ **Alper Daldal, MD, Onur Odabasi, MD, and Bulent Serbetcioglu, MD, PhD.** The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* (2007) 137, 747-752
- ✓ **Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. and 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, 271±278.
- ✓ **Arpalahti, J.** In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zurich; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999; pp 207–222.
- ✓ **Ashkenazi, A., and Dixit, V.M.** (1998). Death receptors: signaling and antioxidant defense system. *Toxicological Sciences* 47, 195–202.
- ✓ **B. Abdallah, L. Sachs and B. A. Demeneix.** Non-viral gene transfer: applications in developmental biology and gene therapy. *Biology of the Cell* (1995) 85, (1–7) (Printed in Great Britain)
- ✓ **Baetz, T., Belch, A., Couban, S., Imrie, K., Yau, J., Myers, R., Ding, K., Paul, N., Shepherd, L., Iglesias, J., Meyer, R., Crump, M.,** 2003. Gemcitabine, dexamethasone and cisplatin is an active and nontoxic chemotherapy regimen in relapsed or refractory Hodgkin's disease: a phase II study by the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann. Oncol.* 14 (12), 1762–1767.
- ✓ **Ballard, P.L., Baxter, J.D., Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Tomkins, G.M.,** 1974. General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues. *Endocrinology* 94, 998–1002.
- ✓ **Baxter, J.D., Rousseau, G.G.,** 1979. Glucocorticoid hormone action: an overview. In: Baxter, J.D., Rousseau, G.G. (Eds.), *Glucocorticoid Hormone Action*. Springer, Berlin, pp. 1–24.
- ✓ **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.
- ✓ **Biagi, J.J., Herbert, K.E., Smith, C., Abdi, E., Leahy, M., Falkson, C., Wolf, M., Januszewicz, H., Seymour, J.F., Richards, K., Matthews, J.P., Dale, B., Prince, H.M.,** 2005. A phase II study of dexamethasone, ifosfamide, cisplatin and etoposide (DICE) as salvage chemotherapy for patients with relapsed and refractory lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 46 (2), 197–206.
  - ✓ **Blakely, B.W., Gupta, A.K., Myers, S.F., Schwan, S.,** 1994. Risk factors for ototoxicity due to cisplatin. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 120, 541^546.
  - ✓ **Böhm, I. & Schild H. (2003).** Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imag. Biol.*, 5 (1): 2–14.
  - ✓ **Borjeson, S., Hursti, T.J., Tishelman, C., Peterson, C., Steineck, G.,** 2002. Treatment of nausea and emesis during cancer chemotherapy. Discrepancies between antiemetic effect and well-being. *J. Pain. Symptom Manage.* 324, 345–358.
  - ✓ **Brown, J.N., Miller, J.M., Altschuler, R.A., Nuttall, A.L.,** 1993. Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hear. Res.* 70, 167–172.
  - ✓ **Cardinaal, R.M., De Groot, J.C.M.J., Huizing, E.H., Veldman, J.E., Smoorenburg, G.F.,** 2000. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 144, 135^146.
  - ✓ **Chandrasekhar SS.** Intratympanic dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss: clinical and laboratory evaluation. *Otol Neurotol* 2001;22:18 –23.
  - ✓ **Chen W, Cacciabue-Rivolta DI, Moore HD et al.** The human fetal cochlea can be a source for auditory progenitors/stem cells isolation. *Hear Res* 2007;233:23–29.
  - ✓ **Cho Younsook; Gong Tzy-Wen L; Kanicki Ariane; Altschuler Richard A; Lomax Margaret I:** 2004. Noise overstimulation induces immediate early genes in the rat cochlea. *Brain research. Molecular brain research* 2004;130(1-2):134-48.
  - ✓ **Chrousos, G.P.,** 1995. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* 332, 1351–1362
- cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Hearing Research* 151, 61–70.

- ✓ **Cohen, G. L.; Ledner, J. A.; Bauer, W. R.; Ushay, H. M.; Caravana, C.; Lippard, S. J.** *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2487–2488.
- ✓ **Cohen, S.M. et al.** (2005) Primary care approach to hearing loss: the hidden disability. *Ear Nose Throat J.* *84*, 26–44
- ✓ **Cohen, S.M., Lippard, S.J.**, 2001. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *67*, 93–130.
- ✓ **Coleman B, Hardman J, Coco A et al.** Fate of embryonic stem cells transplanted into the deafened mammalian cochlea. *Cell Transplant* 2006;15:369–380
- ✓ **Colin Adrain<sup>1</sup> and Seamus J. Martin.** Apoptosis: Calling Time on Apoptosome Activity. *Sci. Signal.*, 6 October 2009 Vol. **2**, Issue 91, p. pe62 [DOI: 10.1126/scisignal.291pe62]
- ✓ **Daniel, T.O., Liu, H., Morrow, J.D., Crews, B.C., Manett, L.J.**, 1999. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2- dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.* *59*, 4574–4577.
- ✓ **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
- ✓ **Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C.** (1998). *EMBO J.* *17*, 2215–2223
- ✓ **Doak, T.G., F.P. Doerder, C.L. Jahn, and G. Herrick.** 1994. A proposed superfamily of transposase genes: transposon-like elements in ciliated protozoa and a common “D35E” motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*:942-946.
- ✓ **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X.** (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, *102*, 33–42.
- ✓ **Dupuy, A.J., S. Fritz, and D.A. Largaespada.** 2001. Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. *Genesis.* *30*: 82-88.
- ✓ **Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH.** *Annu Rev Biochem.* *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424
- ✓ **Emilio Arch-Tirado<sup>\*</sup>, Antonio Verduzco-Mendoza, Verónica Taboada-Picazo<sup>\*</sup>, Daniel Mota-Rojas<sup>†</sup>, Maria de Lourdes Alonso-Spilsbury<sup>‡</sup> and Alfonso Alfaro-Rodríguez<sup>\*</sup>.** Analysis of Normal and Denervated

- Laryngeal Vocalization in Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Journal of Voice* Volume 23, Issue 1, January 2009, Pages 34-39.
- ✓ **Estrem, S.A., Babin, R.W., Ryu, J.H., Moore, K.C.**, 1981. Cis-diamminedichloroplatinum(II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 89, 638-645
  - ✓ **Evans, P., Halliwell, B.**, 1999. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann. NY Acad. Sci.* 884, 19<sup>40</sup>.
  - ✓ **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. *The Laryngoscope* 111, 1147–1155
  - ✓ **Fischer, S.E., E. Wienholds, and R.H. Plasterk.** 2001. Regulated transposition of a fish transposon in the mouse germ line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 6759-6764
  - ✓ **Froeschke, M., Basler, M., Groettrup, M. and Dobberstein, B.** (2003). Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C. *J. Biol. Chem.* 278:41914-41920.
  - ✓ **Fuertes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Perez, J. M.** *Curr. Med Chem. Anti-Cancer Agents* 2002, 2, 539–551.
  - ✓ **Gabaizadeh, R., Stecker, H., Liu, W., Kopke, R., Malgrange, B., Lefebvre, P.P., Van de Water, T.R.**, 1997. Protection of both auditory hair cells and auditory neurons from cisplatin induced damage. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 117, 232-238
  - ✓ **Gately, D. P.; Howell, S. B.** *Br. J. Cancer* 1993, 67, 1171–1176.
  - ✓ **Guo, Z.; Sadler, P. J.** *Adv. Inorg. Chem.* 2000, 49, 183–306.
  - ✓ **Hambley, T. W.** *Coord. Chem. Rev.* 1997, 166, 181–223.
  - ✓ **Haynes, B.F., Pikus, A., Kaiser-Kupfer, M., Fauci, A.S.**, 1981. Successful treatment of sudden hearing loss in Cogan\_s syndrome. with corticosteroids. *Arthritis. Rheum.* 24, 501–503.
  - ✓ **Hazard, W.R. et al.** (1990) *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology* (2nd edn), McGraw-Hil
  - ✓ **Hee-Je Park a,1, Hyung-Jin Kim b,1, Gi-Sang Bae a,1, Sang-Wan Seo a,c, Do-Yun Kim a, Won-Seok Jung a, Min-Sun Kim a, Mi-Young Song d, Eun-Kyung Kim d, Kang-Beom Kwon d, Sung-Yeon Hwang a, Ho-Joon Song a, Cheung-Seog Park c, Rae-Kil Park b, Myong-Soo Chong e, Sung-Joo Park**

- a, Selective GSK-3b inhibitors attenuate the cisplatin-induced cytotoxicity of auditory cells. *Hearing Research* 257 (2009) 53–62
- ✓ **Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6
  - ✓ **Hildebrand MS, Dalh HM, Hardman J et al.** Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *JARO* 2005;6:341–354.
  - ✓ **Himeno, C., Komeda, M., Izumikawa, M., Takemura, K., Yagi, M., Weiping, Y., Doi, T., Kuriyama, H., Miller, J.M., Yamashita, T., 2002.** Intra-cochlear administration of dexamethasone attenuates aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig. *Hear. Res.* 167, 61–70.
  - ✓ **Himeno, C., Komeda, M., Izumikawa, M., Takemura, K., Yagi, M., Weiping, Y., Doi, T., Kuriyama, H., Miller, J.M., Yamashita, T., 2002.** Intra-cochlear administration of dexamethasone attenuates aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig. *Hear. Res.* 167, 61–70.
  - ✓ **Hindley, P. and Kitson, N. (2000)** *Mental Health and Deafness*.
  - ✓ **Hu Z, Wei D, Johansson CB et al.** Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp Cell Res* 2005;302:40–47.
  - ✓ **Irazuzta J, pretzlaff R.K, deCourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B.** Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med* 2005 31:146-150. DOI 10.1007/s00134-004-2462-7.
  - ✓ **Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I.** *Proc. Natl. Acad.*
  - ✓ **Ivics, Z., P.B. Hackett, R.H. Plasterk, and Z. Izsvák.** 1997. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. 91: 501-510.
  - ✓ **Ivics, Z., Z. Izsvák, A. Minter, and P.B. Hackett.** 1996. Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5008-5013
  - ✓ **Izsvák, Z., D. Khare, J. Behlke, U. Heinemann, R.H. Plasterk, and Z. Ivics.** 2002. Involvement of a bifunctional, paired-like DNA-binding domain and a transpositional enhancer in Sleeping Beauty transposition. *J. Biol. Chem.* 277: 34581-34588.

- ✓ **Izsvák, Z., Z. Ivics, and R.H. Plasterk.** 2000. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J. Mol. Biol.* 302: 93-102
- ✓ **Jamieson, E. R.; Lippard, S. J.** *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467–2498
- ✓ **Jarden, J.O., Dhawan, V., Moeller, J.R., Strother, S.C., Rottenberg, D.A.,** 1989. The time course of steroid action on blood to brain and blood to tumor transport of 82RB: a positron emission tomographic study. *Ann. Neurol.* 25, 239–245.
- ✓ **Jiang1 X, Wang X.** cytochrome *c*-mediated apoptosis . *Annu. Rev. Biochem.* 2004. 73:87–106
- ✓ **Junop, M.S. and D.B. Haniford.** 1997. Factors responsible for target site selection in Tn10 transposition: a role for the DDE motif in target DNA capture. *EMBO J.* 16: 2646-2655.
- ✓ **Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J., Kalinec, F.,** 2003. A cochlear cell line as an in vitrosystem for drug ototoxicity screening. *Audiology & Neuro-Otology* 8, 177–189.
- ✓ **Kanzaki, J., O-uchi, T., Tsuchihashi, N.,** 1993. Steroid-responsive sensorineural hearing loss: combination therapy with prednisolone and Sairei-to. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 55, 24–29.
- ✓ **Katzman, M. and M. Sudol.** 1995. Mapping domains of retroviral integrase responsible for viral DNA specificity and target site selection by analysis of chimeras between human immunodeficiency virus type 1 and visna virus integrases. *J. Virol.* 69: 5687-5696.
- ✓ **Kawai Y, Taniuchi S, Okahara S, Nakamura M, Gemba M.** Relationship between cisplatin or nedaplatin-induced nephrotoxicity and renal accumulation. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1385–8.
- ✓ **Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD.** Cytochrome *c* activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.* 1997 Aug 1;16(15):4639–4649.
- ✓ **Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, et al.** 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* 1997;18:559 –71. 10.
- ✓ **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.R.**, 1997. Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *The American Journal of Otology* 18, 559–571.
- ✓ **Laurell, G., Bagger-Sjoberg, D.**, 1991. Degeneration of the organ of Corti following intravenous administration of cisplatin. *Acta Otolaryngol.* 111, 891–898
  - ✓ **Legendre, F.; Chottard, J.-C.** In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zurich; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999; pp 223–246.
  - ✓ **Li H, Corrales CE, Edge A et al.** Stem cells as therapy for hearing loss. *Trends Mol Med* 2004;10:309–315
  - ✓ **Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmed M., Alnemri E.S., Wang X.** (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–489.
  - ✓ **Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J.** (1998) *Cell* 94, 491–501
  - ✓ **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
  - ✓ **Lynch, E.D., Gu, R., Pierce, C., Kil, J.**, 2004. Ebselen-mediated protection from single and repeated noise exposure in rat. *The Laryngoscope* 114, 333–337.
  - ✓ **Marks N, Berg M.J.**(1999) Recent advances in neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem. Int.*:195-220.
  - ✓ **Martin, R. B.** In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zurich; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999; pp 183–206.
  - ✓ **Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A.** The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 1998;131:518–26.
  - ✓ **Maurizio Previati a,c,\* , Irene Lanzoni c, Elisa Corbacella c, Sara Magosso c, Sarah Giuffr\_e c, Francesca Francioso d, Diego Arcelli d, Stefano Volinia d, Andrea Barbieri e, Stavros Hatzopoulos c, Silvano Capitani a,c, Alessandro Martini.** RNA expression induced by cisplatin in an organ of Corti-derived immortalized cell line. *Hearing Research* 196 (2004) 8–18.

- ✓ **McCabe, B.F.**, 1979. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 88, 585–589
- ✓ **Mellor, D. P.** *Chem. Rev.* **1943**, 33, 137–183
- ✓ **Mikhailov, V., Mikhailov, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A., and Saikumar, P.** (2001). Bcl-2 prevents bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 276, , 18361-18374 modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- ✓ **Nagata, S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355–365
- ✓ **Niidome, T, Huang, L.** **Gene:** Therapy: progress and suspects non viral vectors. *Gene tHer.*:2002; 9:1647-52
- ✓ **Ortiz-Urda, S, Q. Lin, S.R. Yant, D. Keene, M.A. Kay, and P.A. Khavari.** 2003. Sustainable correction of junctional epidermolysis bullosa via transposon-mediated nonviral gene transfer. *Gene Ther.* 10: 1099-1104.
- ✓ **Parnes, L.S., Sun, A.H., Freeman, D.J.,** 1999. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. *Laryngoscope* 109, 1–17.
- ✓ **Peyrone, M.** *Ann.* **1845**, 51, 15
- ✓ **Pierson, M, Moller, AR.** Profilaxis of kanamycin induced ototoxicity by a radioprotectant *Hear Res* 1981, 4:79-87.
- ✓ **Plasterk, R.H., Z. Izsvák, and Z. Ivics.** 1999. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* 15: 326-332
- ✓ **Prieskorn, D.M., Miller, J.M., 2000.** Technical report: chronic and acute intracochlear infusion in rodents. *Hear. Res.* 140, 212–215.
- ✓ **Rassu, G.** 2003. Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate. Edizione Italiana: Numero 0 - Luglio 2005 *Editore:* MEDICAL SYSTEMS SpA
- ✓ **Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P.,** 1995. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant defense system. *Pharmacol. Toxicol.* 76, 386–394.
- ✓ **Rayleigh, L.** 1876. "On Waves," *Phil. Mag.*, Vol 1, pp 257-279.  
receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res.* 174, 45–54
- ✓ **Rodrigues C.M.P., Ma X., Linehan-Stieers C., Fan G., Kren B.T., Steer C.J.** (1999) Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 6842–854.

- ✓ **Rosenberg, B.; Van Camp, L.** *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1799–1802.
- ✓ **Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T.** *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- ✓ **Rossi, G.** 1997. Trattato di otorinolaringoiatria. Ed.Minerva Medica
- ✓ **Roy,N., Deveraux,Q.L., Takahashi,R., Salvesen,G.S. and Reed,J.C.** (1997)  
The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of speci@c caspases.  
EMBO J., 16, 6914±6925.
- ✓ **Rybak LP, Husain K, Evenson L, et al.** Protection by 4-methylthiobenzoicacid  
against cisplatin-induced ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol*  
1997;81:173–9.
- ✓ **Rybak, L.P., Husain, K., Whitworth, C., Somani, S.M.,** 1999. Dose  
dependentprotection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats:
- ✓ **Saęrstein, R., Winston, J., Goldstein, M., Moel, D., Dikman, S.,Guttenplan,  
J.,** 1986. Cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Kidney Dis.* 8, 356-367.
- ✓ **Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y.** Effect of cisplatin on the activities of enzymes  
which protect against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1992;43:1873–5
- ✓ **Sakamoto T, Nakagawa T, Endo T et al.** Fates of mouse embryonic stem cells  
transplanted into the inner ears of adult mice and embryonic chickens. *Acta  
Otolaryngol Suppl* 2004;551:48–52.
- ✓ **Shaw, E.A.G. (1974).** The external ear. In: *Handbook of Sensory Physiology*  
(Vol. VI): Auditory System, Keidel, W.D., and Neff, W.D. (Eds.). New York:  
Springer-Verlag.
- ✓ **Shea Jr., J.J., Ge, X.,** 1996. Dexamethasone perfusion of the labyrinth plus  
intravenous dexamethasone for Meniere\_s disease. *Otolaryngol. Clin. North.  
Am.* 29, 353–358.
- ✓ **Silverstein, H., Choo, D., Rosenberg, S.I., Kuhn, J., Seidman, M.,Stein, I.,**  
1996. Intratympanic steroid treatment of inner ear disease and tinnitus. *Ear Nose  
Throat J.* 75, 468^471.
- ✓ **Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD,  
Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR and Martin SJ.**  
(1999). *J. Cell Biol.*, **144**, 281–292.
- ✓ **Smets, L.A., Van den Berg, J.D.,** 1996. Bcl-2 expression and glucocorticoid-  
induced apoptosis of leukemic and lymphoma cells. *Leuk. Lymphoma* 20, 199–  
205.

- ✓ **Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y et al.:** A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001, 410:112-116.
- ✓ **Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM.** Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin induced toxicity in rats. *Biomaterials* 1996;9:139–42.
- ✓ **Stuart, R.A. and Neupert, W. (1990)** Apocytochrome c: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway. *Biochimie*, 72, 115±121.
- ✓ **Tanaka T, Hanafusa N, Ingelfinger JR, Ohse T, Fujita T, and Nangaku M.** 2003. Hypoxia induces apoptosis in SV40-immortalized rat proximal tubular cells through the mitochondrial pathways, devoid of HIF1-mediated upregulation of Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 222–231.
- ✓ **Tange, R.A., Vuzevski, V.D.,** 1984. Changes of the stria vascularis of the guinea pigs due to cisplatin. *Arch. Otorhinolaryngol.* 239, 41-47.
- ✓ **Teranishi, M., Nakashima, T., Wakabayashi, T.,** 2001. Effects of alpha-tocopherol on
- ✓ **Teranishi, R., and Shaw, E.A.G. (1968).** External ear acoustic models with simple geometry. *Journal of the Acoustical Society of America*, 44, 257-263.
- ✓ **Thomas, m, Klibanov, A, M.** 2003. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. Volume 62, Numer 1, 27, 34. DOI:10.1007/s00253-003-1231-8
- ✓ **Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998).** Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316.
- ✓ **Trevisi, M, Ricci, D.** 1998 Anatomia funzionale dell' apparato audio foniatrico. Ed Ambrosiana.
- ✓ **Trimmer, E.E., Essigmann, J.M.,** 1999. Cisplatin. *Essays Biochem.* 34, 191^211.
- ✓ **Troiani D, Ferraresi, A.** 2006. *Fisiologia Umana*, appunti.
- ✓ **Tsukasaki, N., Whitworth, C.A., Rybak, L.P.,** 2000. Acute changes in cochlear potentials due to cisplatin. *Hear. Res.* 149, 189-198.
- ✓ **Van Luenen, H.G. and R.H. Plasterk.** 1994. Target site choice of the related transposable elements Tc1 and Tc3 of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 22: 262-269.

- ✓ **Van Ruijven, M.W.M., de Groot, J.C.M.J., Klis, S.F.L., Smoorenburg, G.,** 2005a. Cochlear targets of cisplatin: an electrophysiological and morphological time-sequence study. *Hear. Res.* 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, 43±53.
- ✓ **Vermeulen NP, Baldew GS.** The role of lipid peroxidation in the nephrotoxicity of cisplatin. *Biochem Pharmacol* 1992;6:1193–9.
- ✓ **Vermorken, J.B., Kapteijn, T.S., Hart, A.A., Pinedo, H.M.,** 1983. Ototoxicity of cis-diamminedichloroplatinum(II): influence of dose, schedule and mode of administration. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 53-58.
- ✓ **Vilma Maldonado a, Jorge Mele´ndez-Zajgla a, Arturo Ortega** Modulation of NF-k B, p53 and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells *Mutation Research* 381 \_1997. 67–75
- ✓ **Vio .M.M., Holme. R.H.** (2005). Hearing loss and tinnitus: 250 million people and a US\$10 billion potential market. *DDT. Volume 10, Number 19* •
- ✓ **Watanabe K, Hess A, Michel O, et al.** Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin-treated cochlea of guinea pigs. *Anticancer Drugs* 2000;11:731–5.
- ✓ **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.
- ✓ **Watanabe, K.I., Hess, A., Bloch, W., Michel, O.,** 2000. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anti-Cancer Drugs* 11, 401–406.
- ✓ **Watanabe, K.I., Hess, A., Bloch, W., Michel, O.,** 2000a. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 11, 401^406.
- ✓ **Watanabe, K.I., Hess, A., Michel, O., Yagi, T.,** 2000b. Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin-treated cochlea of guinea pigs. *Anticancer Drugs* 11, 731^735.
- ✓ **Wei Chen, A, B Stuart L. Johnson, B Walter Marcotti, B Peter W. Andrews, A, B Harry D. Moore, A, B, Marcelo N. Rivolta.** Human Fetal

- Auditory Stem Cells Can Be Expanded In Vitro and Differentiate Into Functional Auditory Neurons and Hair Cell-Like Cells. *STEM CELLS* 2009;27:1196–1204.
- ✓ **Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak J, Coll JT, Golec JM, Swenson L, Wilson KP, Charifson PS:** The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol* 2000, 7:423-432.
  - ✓ **Wei, M.C. et al. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.** *Science*, 292, 727±730.
  - ✓ **Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S.** Free radicals and antioxidants in chemotherapy- induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 1997;23:209–40.
  - ✓ **Wessler, 1976**
  - ✓ **Wimmer, C., Mees, K., Stumpf, P., Welsch, U., Reichel, O., Suckfull, M.,** 2004. Round window application of D-methionine, sodium thiosulfate, brain-derived neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 in cisplatin-induced ototoxicity. *Otol. Neurotol.* 25, 33–40.
  - ✓ **Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997) *Science* 275, 1129–113**
  - ✓ **Yant, S.R., L. Meuse, W. Chiu, Z. Ivics, Z. Izsvák, and M.A. Kay.** 2000. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat. Genet.* 25: 35-41.
  - ✓ **Zayed, H., Izsvák, Z., Khare, D., Heinemann, U. and Z. Ivics.** 2003. The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of Sleeping Beauty transposition. *Nucleic Acids. Res.* 31: 2313-2322.
  - ✓ **Zheng, J.L., Gao, W.Q.,** 1996. Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1897–1905.
  - ✓ **Zou H, Li Y, Liu X, Wang X:** An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999, 274:11549-11556.