



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE
Direttore della Scuola Prof. Eusebio Tolu

INDIRIZZO IN "FISIOLOGIA, MORFOLOGIA,
FARMACOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO"
XXV CICLO

*Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di
tumore mammario MCF-7: analisi morfostrutturale,
di espressione genica e proteica*

Tutor:

Chiar.mo Prof. Andrea Montella

CoTutor:

Chiar.mo Prof. Roberto Madeddu

Dottorando:

Dott.ssa Yolande Asara

Direttore della Scuola:

Chiar.mo Prof. Eusebio Tolu

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

I.INTRODUZIONE	4
I.1 I metalli pesanti	5
I.2 Il Cadmio	8
I.3 Il Cadmio e l'ambiente	9
I.4 Tossicità del Cadmio per l'uomo	13
I.5 Cellule MCF7	23
I.6 Il 5Fluorouracile	27
I.7 MCF-7, Cd, 5-FU	29
II.OBIETTIVI	31
III.MATERIALI E METODI	34
III.1 Allestimento Colture cellulari MCF7 <i>in vitro</i>	35
III.2 Test di citotossicità <i>in vitro</i>	37
III.3 Analisi morfostrutturale, Microscopia Elettronica	38
III.3.1 Microscopia a Trasmissione TEM	38
III.3.2 Microscopia a Scansione SEM	40
III.4 Immunofluorescenza	42
III.4.1 Studio delle proteine del citoscheletro: Actina e Tubulina	42
III.5 Studio Espressione Genica	43
III.5.1 Estrazione Rna e retro trascrizione in cDna	43
III.5.2 Real Time Pcr con Sybr Green	43
III.6 Studio Espressione Proteica	47
III.6.1 Estrazione delle proteine	47

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

III.6.2 Western Blot	48
IV.RISULTATI	49
IV.1 Test di citotossicità <i>in vitro</i>	50
IV.2 Microscopia elettronica a trasmissione e a scansione SEM-TEM	50
IV.2.1 Cd	50
IV.2.2 5-FU	52
IV.2.3 Cd + 5-FU	52
IV.3 Immunofluorescenza, Actina e Tubulina	57
IV.3.1 Cd	57
IV.3.2 5-FU	58
IV.3.3 Cd + 5-FU	58
IV.4 Espressione Genica	62
IV.5 Espressione Proteica	72
V. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	75
VI.BIBLIOGRAFIA	84
VII.SITOGRAFIA	93

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

INTRODUZIONE

Autore: Yolande Asara
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7:
analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.
Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

I.INTRODUZIONE

I.1 I metalli pesanti

I metalli pesanti sono elementi chimici metallici che hanno una densità relativamente alta e sono tossici anche a basse concentrazioni. I metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre e non vengono in nessuna maniera degradati o distrutti. Possono essere facilmente assorbiti dall'organismo umano, pur se in piccola misura tramite la respirazione dell'aria inquinata, l'assunzione di alimenti, di acqua. Inoltre si possono avere facili contaminazioni da piombo dell'acqua potabile causate da tubature non sempre adeguate, i rifornimenti idrici possono essere contaminati da scarti industriali. Non sono altresì da sottovalutare gli effetti della pioggia acida che penetrando nel suolo causa infiltrazioni di metalli pesanti nei corsi d'acqua, nei laghi, nei fiumi e nell'acqua freatica. Alcuni metalli pesanti sono tuttavia essenziali in tracce per il mantenimento del metabolismo corporeo, ad esempio il rame, il selenio e lo zinco, mentre ad alte concentrazioni possono causare avvelenamento. Sono state proposte delle definizioni di metallo pesante basate sulla densità o sul peso atomico, ossia un metallo pesante è un elemento chimico con una densità maggiore di 5 grammi per centimetro cubo oppure un elemento chimico il cui peso atomico sia maggiore di 20. Le caratteristiche chimiche dei metalli pesanti, il carattere cationico con diversi stati di ossidazione e l'attitudine a formare complessi molecolari

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

nel citoplasma cellulare, fa sì che vengano inclusi nell'elenco dei metalli pesanti anche elementi, come il selenio e l'arsenico, che non sono metalli, sebbene siano dotati di proprietà fisiche e chimiche simili a quelle dei metalli (Barbucci R.). Per questi motivi è stato talora proposto di abbandonare la classificazione in base alla densità o al peso atomico in favore di una nuova classificazione tripartita degli elementi chimici a seconda che esibiscano una prevalente affinità per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo, o infine un comportamento intermedio tra le due precedenti categorie. I metalli pesanti includono il mercurio (Hg), il cadmio (Cd), l'arsenico (As), il cromo (Cr), il tallio (Tl) ed il piombo (Pb). I tre metalli pesanti più inquinanti sono piombo, cadmio e mercurio. Esistono elementi chimici, un sottogruppo dei metalli, detti elementi in traccia, presenti nei fluidi biologici degli organismi viventi in concentrazioni inferiori a 1 µg per grammo di peso. In base agli effetti fisiopatologici i metalli in traccia possono essere suddivisi in due gruppi: nel primo gruppo gli elementi essenziali per la vita in quanto implicati in importanti processi metabolici, mentre nel secondo gruppo sono contenuti elementi tossici per gli organismi viventi anche a basse concentrazioni. Sono noti quindici elementi in traccia, essenziali per l'organismo umano: arsenico, cobalto, cromo, rame, fluoro, ferro, iodio, manganese, molibdeno, nichel, selenio, silicio, stagno, vanadio e zinco, mentre il secondo gruppo contiene elementi quali cadmio, mercurio, cromo e piombo (Barbucci R.; Borgese F.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

La pericolosità dei metalli pesanti sta nel fatto che hanno tendenza a bio-accumularsi nell'organismo umano. Gli elementi chimici estranei si accumulano negli esseri viventi ogni qualvolta vengono assimilati ed immagazzinati più velocemente di quanto non vengano metabolizzati dall'organismo stesso ed eliminati (Bocca B.; Forte G.; Madeddu R. 2012; Suresh Vir Singh Rana).

Metalli quali l'arsenico, il cadmio, il piombo e il mercurio sono composti chimici che si trovano in natura. Possono essere presenti a concentrazioni diverse nell'ambiente, ad es. nel terreno, nell'acqua e nell'atmosfera. Possono anche trovarsi nei prodotti alimentari sotto forma di residui a causa della loro presenza nell'ambiente provocata da attività umane, quali l'agricoltura o l'industria, dai gas di scarico di autoveicoli o dalla contaminazione durante la lavorazione o la conservazione degli alimenti. L'esposizione delle persone a questi metalli può avvenire attraverso l'ambiente o attraverso l'ingestione di cibi o acqua contaminati (Falcó G.; Galal-Gorchev H.; Madeddu R. 2011; Sirot V.). Il loro accumulo nell'organismo può produrre effetti nocivi nel corso del tempo. I metalli sono elementi naturalmente presenti nell'ambiente e vengono assimilati con varie modalità dall'organismo umano. L'avvento dell'industrializzazione e la conseguente immissione nell'ambiente di quantità sempre maggiori di metalli, associata alla loro notevole resistenza alla degradazione, hanno causato numerose ripercussioni sociali, economiche e sanitarie (Bonsignore A.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

I.2 Il Cadmio

Il cadmio è un metallo brillante, bianco-argento, duttile e molto malleabile, tossico e relativamente raro. La sua superficie ha riflessi azzurrognoli e la sua consistenza è tale da poter essere tagliato con la lama di un coltello (Fig. 1.). Il Cd è solubile in acidi. Per molti aspetti il Cd è simile allo zinco, con il quale è in antagonismo biologico negli organismi viventi, ma tende a formare composti più complessi di quest'ultimo.

L'elemento chimico Cd ha numero atomico 48, aspetto metallico.

Nei suoi composti ha numero di ossidazione +2. Sono noti alcuni rari casi in cui ha numero di ossidazione +1. Il cadmio che si trova in natura consiste di 6 isotopi stabili. Sono stati inoltre individuati 27 radioisotopi di cui i più stabili sono ^{113}Cd con un'emivita di $7,7 \cdot 10^{15}$ anni, ^{109}Cd (462,6 giorni) e ^{115}Cd (53,46 ore). Tutti gli altri hanno tempi di dimezzamento inferiori a 2,5 ore e la maggior parte di loro inferiore a 5 minuti. Questo elemento ha inoltre 8 metastati di cui i più stabili sono ^{113}Cdm (emivita: 14,1 anni), ^{115}Cdm (44,6 giorni) e ^{117}Cdm (3,36 ore).

Gli isotopi del cadmio hanno un peso atomico che va da 96,935 amu (^{97}Cd) a 137,934 (^{138}Cd). La principale modalità di decadimento degli isotopi più leggeri di ^{112}Cd è la cattura elettronica con conseguente trasformazione in argento, per gli altri è il decadimento beta con trasformazione in indio (Barbucci R.; Borgese F.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari



Fig.1. Cadmio

I.3 Il Cadmio e l'ambiente

Il cadmio è prodotto come inevitabile sottoprodotto del raffinamento dello zinco e del piombo, presenti all'interno di minerali grezzi.

Una quantità di cadmio molto elevata è naturalmente scaricata nell'ambiente, circa 25.000 tonnellate all'anno. Circa la metà di questo cadmio è scaricata nei fiumi attraverso l'erosione delle rocce e una parte di cadmio viene scaricata in aria attraverso incendi boschivi e vulcani. Il resto del cadmio è liberato attraverso le attività umane, come la lavorazione.

Nessun minerale di cadmio è estratto per il metallo, perché è prodotto in quantità sufficiente come sottoprodotto della fusione dello zinco dal relativo minerale, la sfalerite (ZnS), nel quale il cadmio è un'impurità significativa, costituendo fino al 3%. Di conseguenza, le zone estrattive principali sono quelle connesse con lo zinco. La produzione mondiale è

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

di circa 14.000 tonnellate all'anno, il paese produttore principale è il Canada, insieme a Stati Uniti, Australia, Messico, Giappone e Perù.

Il Cd viene principalmente usato per la produzione di batterie energetiche ricaricabili cadmio-nichel, ritenute utili all'sistema industriale perché di lunga durata e bassa manutenzione e elevata resistenza a stress fisico ed elettrico. Il Cd viene anche utilizzato nei materiali di rivestimento, per la buona resistenza alla corrosione, quindi utile negli ambienti marini e aerospaziali dove è richiesta sicurezza elevata del materiale. Il Cd viene anche impiegato nella produzione di pigmenti, stabilizzatori per PVC, leghe ed residui elettronici. Inoltre il Cd è presente anche come materiale di scarto in numerosi prodotti di uso casalingo-industriale, quali fertilizzanti a base di fosforo, detersivi ed i prodotti petroliferi raffinati.

Tra gli altri usi si annoverano:

- l'impiego in leghe metalliche basso fondenti e per saldatura
- l'impiego in leghe metalliche ad alta resistenza all'usura
- l'impiego nelle *cadmiature*, ovvero nel rivestimento di materiali con un film di cadmio metallico tramite elettrodeposizione
- l'impiego come barriera per controllare le reazioni di fissione nucleare
- l'impiego nella produzione di fosfori per televisori in bianco e nero e di fosfori blu e verdi per televisori a colori

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

- il solfuro di cadmio è un pigmento giallo, viene quindi utilizzato nella produzione di vernici di colore giallo
- l'impiego in alcuni semiconduttori
- alcuni composti del cadmio sono degli stabilizzanti per il PVC
- il cadmio è stato usato per costruire il primo rivelatore di neutrini

Inoltre il cadmio (dal latino *cadmia*, a sua volta dal greco *kadmeia*, calamina = scaglia di laminazione) fu scoperto nel 1817 in Germania da Friedrich Strohmeyer, che lo individuò tra le impurità della calamina, un minerale a base di carbonato di zinco, notando che alcuni campioni impuri di calamina cambiavano colore per riscaldamento, a differenza della calamina pura.

Benché il cadmio ed i suoi composti siano molto tossici, la farmacopea britannica (*British Pharmaceutical Codex*) del 1907 elenca lo ioduro di cadmio tra i medicinali per curare "le giunture ingrossate, la scrofolo e i geloni".

Nel 1927 la Conferenza Internazionale dei Pesi e delle Misure ridefinì il metro come 1.553.164,13 volte la lunghezza d'onda della linea rossa dello spettro del cadmio e tale definizione restò in vigore fino a quando fu sostituita da quella basata sul kripton.

I minerali di cadmio sono rari e si trovano in piccole quantità. La Greenockite (CdS) (Fig. 2.), l'unico minerale di cadmio importante, è

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

quasi sempre associata alla sfalerite (ZnS) (Fig. 3.). Perciò il cadmio viene estratto in genere come sottoprodotto dell'estrazione e della raffinazione dello zinco e, in minor misura, del piombo e del rame. Piccole quantità di cadmio (circa il 10% del consumo totale) provengono dal riciclaggio di rottami di ferro e d'acciaio. La produzione di cadmio negli Stati Uniti iniziò nel 1907, ma l'uso corrente di questo elemento iniziò soltanto dopo la prima guerra mondiale.



Fig. 2. Greenockite



Fig. 3. Sfalerite

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

I.4 Tossicità del Cadmio per l'uomo

Il Cadmio (Cd) è tra i metalli pesanti uno di quelli ritenuti più tossici per la salute dell'uomo, specialmente per la sua facile associazione con aria e acqua, inoltre per la sua importante presenza nel fumo da sigaretta (Nadkarni R.A.).

L'incremento dell'industrializzazione e delle attività lavorative umane hanno da sempre portato ad un forte utilizzo di sostanze contenenti metalli pesanti, con il risultato di un'importante e considerevole eco dispersione, con conseguenze economiche e sociali, potenzialmente dannose per la salute umana.

L'assorbimento del Cd nell'organismo umano può avvenire in diverse maniere, per inalazione, ingestione e per contatti con la cute.

Il Cd ha un'emivita piuttosto lunga, che è compresa tra i 15 e i 40 anni con una media intorno ai 20/25 anni. Si accumula molto facilmente nel fegato e nei reni. Il Cd è considerato uno dei metalli pesanti più pericolosi, in particolare per l'uomo, a causa dei suoi effetti teratogenici e carcinogenici dimostrati scientificamente sia in vivo che su modelli animali (Liu Y.; Waalkes MP. 1988; Waalkes MP. 2003).

Il cadmio non riveste alcun ruolo biologico nel corpo umano. Sia esso che i suoi composti sono tossici perfino a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi.

In alcuni paesi il Cd è stato usato in passato e purtroppo continua ad esser usato, nei pesticidi e nei fungicidi, contaminando fortemente l'ambiente dopo il suo utilizzo.

Nelle persone non esposte professionalmente le principali cause di esposizione al cadmio sono il fumo di sigaretta (Lewis GP.; Madeddu R. 2009), incluso il fumo passivo, dove il metallo viene vaporizzato durante la combustione e il cibo contaminato introdotto nella dieta (Galal-Gorchev H.; Moy G.).

L'esposizione nell'uomo fumatore, di circa 20 sigarette al giorno, ammonta a circa 2-4 μg (Lewis GP.; Madeddu R. 2009).

Le derrate alimentari ricche di cadmio sono di varia origine, ad esempio alimenti particolarmente incriminati come potenzialmente contaminati da Cd dove sono state trovate le più alte concentrazioni di Cd, sono fegato e frattaglie animali in genere, funghi, crostacei, molluschi e mitili, polvere di cacao, alghe secche. Altri alimenti potenzialmente contaminati da cadmio sono vegetali coltivati su terreni inquinati (da acque nere, fertilizzanti, acque di irrigazione a valle di siti industriali); pesci d'oceano (tonno, merluzzo, molluschi); cibi raffinati (farina, riso, zucchero bianco). Consumo di; acqua potabile contaminata (in caso di tubature galvanizzate o in plastica nera) e di bevande a base di cola o caffè istantaneo (Oskarsson A.; Falcó G.; Galal-Gorchev H.).

Generalmente per le persone che non fumano, la via principale di esposizione si ha attraverso gli alimenti. L'aggiunta di cadmio al terreno

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

agricolo attraverso varie fonti (di lavorazione del terreno, di inquinamento ambientale e industriale) fa sì che venga coinvolta gran parte delle catene alimentari sino ad arrivare all'essere umano (Fig. 4.) (Oskarsson A.).

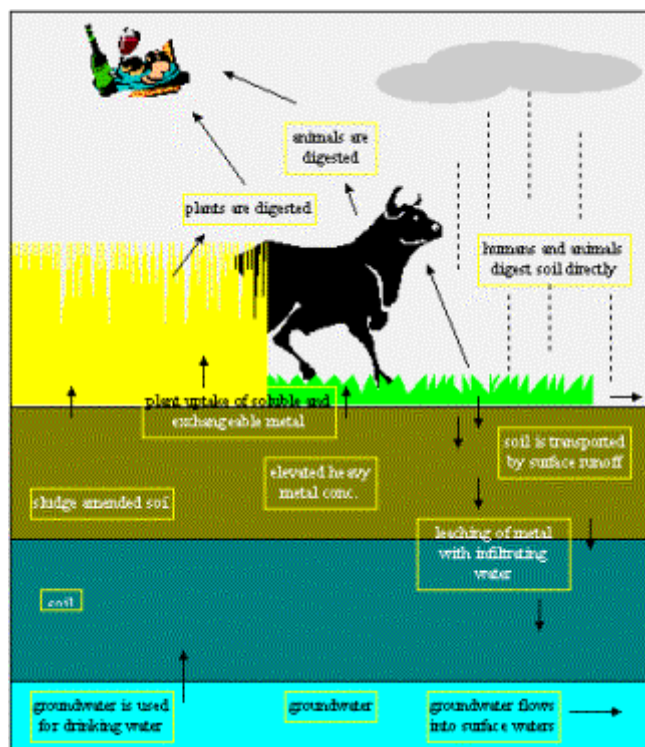


Fig. 4. “Ciclo” del Cadmio, dal suolo agli alimenti.

Da non sottovalutare l'esposizione al Cd di quelle popolazioni che vivono in zone nelle cui vicinanze siano presenti discariche di rifiuti o fabbriche di raffinazione del metallo che scaricano Cd nell'aria. Il cadmio è un metallo molto utilizzato in agricoltura e nell'industria, quindi è un importante contaminante ambientale. I canali di scarico industriali

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

sbocciano generalmente sul terreno. La produzione di fertilizzanti artificiali a base di fosforo, porta ad una certa emissione di Cd. Una buona parte del Cd viene rilasciata, dopo l'applicazione del fertilizzante sul terreno da coltivare, la parte rimanente si deposita nelle acque superficiali. Il Cd viene trasportato per lunghe distanze dal fango che si forma nelle acque andando a contaminare grandi estensioni di terreno e di corsi d'acqua superficiale. Il Cd viene assorbito dalla materia organica del suolo e diventa fortemente pericoloso, entrando facilmente nel sistema della catena alimentare. Nei terreni acidificati, resi tali ad esempio da pioggia acida, si ha aumento dell'assorbimento di Cd da parte delle piante (Tremlová J.; Huynh T.).

I vermi di terra ed altri organismi essenziali per il terreno sono estremamente suscettibili all'avvelenamento da Cd, anche a basse concentrazioni, portando gravi conseguenze alla struttura del terreno minacciando l'intero ecosistema del suolo.

Negli ecosistemi acquatici il Cd può bio-accumularsi in mitili, ostriche, gamberi, aragoste e pesci. La predisposizione al Cd varia notevolmente fra gli organismi acquatici. Gli organismi di acque salmastre sono più resistenti al Cd rispetto a quelli di acque dolci.

Altre possibili cause di inquinamento per l'uomo derivano principalmente per i lavoratori esposti professionalmente dalle fabbriche di smaltimento di pile e batterie contenenti cadmio; miniere ; fabbriche di lavorazione di metalli tipo zinco; saldature delle lattine per alimenti; olio

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

dei motori e scarichi d'automobile; vernici e colori; inceneritori di pneumatici; plastica e colori (Madeddu R. 2012).

Inoltre vi sono numerosi lavoratori a rischio di esposizione e contaminazione giornaliera al Cd: addetti alla produzione di leghe contenenti cadmio, addetti alla cadmiatura di oggetti metallici, addetti alla lavorazione di pigmenti contenenti cadmio, addetti alla saldatura di elettrodi contenenti cadmio (Bonsignore A.).

Nel maneggiare il Cd e i suoi composti è importante lavorare sotto una cappa aspirante in modo da non inalarne i vapori. L'esposizione a lungo termine al cadmio dei lavoratori dei bagni galvanici per cadmiatura produce seri problemi di tossicità.

Nel gennaio 2009 il gruppo CONTAM ha adottato un parere sul cadmio negli alimenti, in cui fornisce una valutazione aggiornata dell'esposizione in Europa e stabilisce una nuova dose settimanale tollerabile (TWI - Tolerable Weekly Intake). Per la popolazione generale, ad eccezione dei fumatori, la fonte principale di esposizione al cadmio è rappresentata dagli alimenti. A seguito dell'analisi di nuovi dati, il gruppo CONTAM ha ridotto la TWI per il cadmio a 2,5 microgrammi per chilogrammo di peso corporeo ($\mu\text{g}/\text{kg p.c.}$). Attualmente l'esposizione media al cadmio degli adulti attraverso la dieta si aggira intorno a questo valore e l'esposizione di determinati sottogruppi, quali i vegetariani e i fumatori, può essere superiore. Tuttavia, il rischio di effetti nocivi, anche nei gruppi con livelli di esposizione superiori alla TWI, è estremamente

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

basso, poiché la TWI non è basata sui danni renali in quanto tali, ma su un indicatore precoce di cambiamenti della funzionalità renale che suggerisce un possibile danno ai reni in futuro.

Nell'uomo il fegato e i reni sono gli organi in cui si accumulano maggiormente il cadmio e lo zinco per tempi considerevoli. La concentrazione totale di cadmio nel corpo umano aumenta con l'età e varia nelle diverse parti del mondo. Essendo assorbito in piccole quantità dall'organismo umano, le quantità assorbite sia tramite l'alimentazione che per via inalatoria, in circostanze normali, non rappresentano un problema per l'uomo; Il cadmio deriva le sue proprietà tossicologiche dalla sua somiglianza chimica allo zinco, un micronutriente essenziale per le piante, gli animali e gli esseri umani, al quale si sostituisce facilmente nei biosistemi (Matovic V.).

Quando si presenti una carenza di zinco nell'alimentazione, l'organismo reagisce accumulando cadmio al suo posto. Se l'assunzione giornaliera di zinco è elevata, lo zinco sarà immagazzinato regolarmente e il cadmio verrà invece eliminato. Quindi lo zinco potrebbe avere un'azione anti-cadmio-cancerogena (Lin YS.; Russel D.).

Sostituisce lo zinco nelle arterie rendendole meno flessibili e creando disturbi cardiovascolari come l'ipertensione.

Antagonizza lo zinco interferendo nella produzione di insulina e nel metabolismo del testosterone, con possibilità di diabete, problemi alla prostata e impotenza.

L'integrazione alimentare prevede l'utilizzo di alte dosi di zinco, che antagonizza l'assorbimento intestinale e la fissazione del cadmio: la dose di attacco può essere di 50-100 mg di zinco al dì (ci riferiamo a integratori in cui lo zinco è in forma chelata, ad esempio orotato di zinco).

Come terapia di supporto si utilizzeranno alimenti ricchi di vitamina C (agrumi, frutta, cavoli), vitamina B6 (lievito di birra, germe di grano, leguminose) e aminoacidi solforati (cisteina, metionina).

Altera il metabolismo di calcio e fosforo dando luogo ad osteoporosi e fragilità dentale.

L'intossicazione da cadmio può essere combattuta anche col selenio. Gli alginati (contenuti nelle alghe) si combinano col cadmio e lo eliminano dal corpo, un procedimento che può prevenire l'avvelenamento. L'assunzione giornaliera di cadmio è stata valutata tra i 13 e i 24 microgrammi, con notevoli variazioni secondo la provenienza e il tipo di alimenti. L'eliminazione giornaliera è di 10 microgrammi per litro.

Si presume che l'organismo umano sia costantemente sottoposto ad un esposizione al Cd dall'aria e dall'acqua con cui viene in contatto giornalmente, l'assunzione quotidiana media è stata stimata intorno a 0.15 µg dall'aria e 1 µg dall'acqua.

L'avvelenamento cronico da cadmio è un processo estremamente lento, che può andare avanti per tutta la vita.

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (AIRC) ha

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

classificato il Cd come appartenente alla categoria 1 di sostanze ritenute carcinogeniche per l'uomo. E' stato provato che il Cd induce in particolar modo carcinoma polmonare, inoltre negli ultimi anni si sono evidenziate strette correlazioni tra tumore al fegato, neoplasie ematopoietiche, tumore alla vescica e allo stomaco e al pancreas (Benbrahim-Tallaa L.; Geth Gunawardana C.; Waalkes 1988; Waalkes 2003;).

Il cadmio è un metallo estremamente tossico che provoca numerose patologie tra cui alcune letali come attacchi di cuore, cancro e diabete. Si accumula in diversi organi, tra i quali in particolare i reni, e il fegato. È molto più tossico del piombo e del mercurio. Il cadmio si deposita nei reni, causando problemi renali, e si stabilisce poi nelle arterie, aumentando la pressione arteriosa e causando l'arteriosclerosi.

Nell'esposizione cronica da cadmio, le polveri giocano un ruolo considerevole, infatti vengono assorbite soprattutto per via inalatoria ed in minima parte tramite cute e mucose. Una volta assorbito, il Cd si lega ai globuli rossi e alle proteine plasmatiche per poi accumularsi nel fegato e nei reni. In questi organi può permanere anche per diversi anni, rendendone difficile il monitoraggio biologico.

Il Cd plasmatico si lega principalmente alla metallotioneina, una proteina plasmatica contenente diversi gruppi sulfidrilici; la proteina contenente cadmio viene eliminata attraverso la filtrazione glomerulare per poi essere riassorbita dalle cellule del tubulo prossimale, nelle quali provoca tossicità (Shimoda R.). La larga quota riassorbita spiega perché nelle fasi

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

iniziali dell'esposizione il cadmio venga debolmente escreto con le urine; successive e durature esposizioni fanno sì che la tossicità sulle cellule tubulari porti all'incapacità da parte del rene di riassorbire il cadmio escreto, con cadmiuria rilevante.

Nell'uomo, l'esposizione cronica, inoltre può causare affezioni polmonari ostruttive con lo sviluppo di carcinoma polmonare, disfunzioni renali, patologie dell'apparato scheletrico quali osteomalacia e osteoporosi. Inoltre il cadmio è coinvolto in altre patologie, al momento vi sono studi sugli animali non ancora confermati sull'uomo, come l'ipertensione, effetti sul miocardio, diabete e patologie neurodegenerative (Waalkes MP. 2003).

Come già precedentemente detto nell'esposizione cronica, l'organo bersaglio principale del cadmio è il rene. La malattia derivante è la glomerulopatia e la tubulopatia con conseguente proteinuria. Con il tempo si instaura anche aminoaciduria, glicosuria, iperfosfaturia e calciuria. Quest'ultimo elemento è il principale responsabile dei quadri di osteoporosi, osteomalacia e calcolosi delle vie urinarie presenti nei soggetti cronicamente esposti al cadmio. Le polveri e i fumi di cadmio sono inoltre chiamati in causa come induttori di enfisema polmonare e carcinoma polmonare. Altri quadri caratteristici sono l'atrofia delle mucose nasali e conseguente anosmia. Vi può inoltre essere anemia ferro carenziale per riduzione dell'assorbimento del ferro, epatopatia e colorazione giallognola dello smalto dentale.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

L'unico indicatore di dose disponibile è il cadmio urinario. Inoltre per l'immagazzinamento nel parenchima epatico e renale, la cadmiuria può rimanere elevata anche dopo molto tempo dall'esposizione.

La nefropatia da cadmio provoca l'escrezione di diverse proteine a basso peso molecolare. Per questo, se vi è cadmiuria, ritrovare queste proteine a livello renale è un indicatore tipico di danno renale. Tra queste hanno particolare importanza la n-acetilglucosaminidasi e la proteina legante il retinolo.

Un'esposizione acuta a polveri di cadmio pari a 5 mg/m^3 è letale per l'uomo in circa 8 ore di tempo; esposizioni pari a 1 mg/m^3 possono invece dare una tossicità rilevante a livello dell'albero respiratorio, con dispnea, tosse, febbre ed astenia. L'ingestione di alimenti contaminati con cadmio provoca invece una sindrome gastroenterica caratterizzata da diarrea, nausea, vomito e disidratazione. Altri effetti sulla salute possono essere: fratture alle ossa, problemi riproduttivi sino ad infertilità, danneggiamento del sistema nervoso centrale, danneggiamento del sistema immunitario, disordini psicologici, possibilità di danni al DNA e sviluppo del cancro (Jin YH.).

Alcuni studi hanno evidenziato che esiste un rapporto tra cadmio alopecia, diarrea, anemia, deficit immunologici e renali. Vi è una buona correlazione tra l'eccesso di cadmio misurato con il mineralogramma del capello e la sua concentrazione nei reni: il valore massimo di riferimento nel capello è pari a 0,10 ppm (parti per milione).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Infine negli ultimi anni molti autori hanno concentrato la loro attenzione sull'antagonismo tra cadmio ed estrogeni, dei quali mima gli effetti (Byrne C.; Martin MB.). Infatti non solo è in grado di legarsi ai recettori degli estrogeni, ma anche di indurre modificazioni sia sulla struttura che sulle funzioni di tali recettori (Johnson MD.; Kovala-Demertzi D.). La relazione dell'espressione e dell'attività dei recettori estrogenici gioca un ruolo molto importante nell'insorgenza e nella differenziazione delle neoplasie estrogeno dipendenti come il carcinoma mammario (Antilla E.).

I.5 Cellule di carcinoma mammario MCF-7

La linea cellulare MCF-7 è una linea di tumore mammario isolata nel 1970 da una donna Americana Caucasica di 69 anni. MCF-7 è l'acronimo del Michigan Cancer Foundation - 7, istituto di Detroit (USA) dove la linea cellulare è stata coltivata e linearizzata nel 1973 da Herbert Soule e i suoi collaboratori (Glodek). Il Michigan Cancer Foundation è ora meglio conosciuto come il Barbara Ann Karmanos Cancer Institute.

Prima di ottenere la linea cellulare MCF-7, era cosa impensabile per un ricercatore nel campo della ricerca oncologica ottenere una linea di cellule mammarie in grado di sopravvivere in coltura cellulare abbastanza a lungo (diversi mesi) da poter completare degli esperimenti di laboratorio *in vitro*.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

La paziente dalla quale si è originata la linea cellulare MCF-7, è deceduta nel 1970. Le sue cellule sono all'origine di tutte le scoperte e attuali conoscenze riguardanti il tumore mammario.

Le caratteristiche principali delle MCF-7 sono quelle di essere: un tumore primario con le potenzialità di essere un carcinoma invasivo, originate da effusione pleurale, con presenza di recettori per gli estrogeni, con risposta proliferativa positiva agli estrogeni, con presenza di recettori progestinici, con potenziale tumoregenicità nel topo da esperimento in presenza di supplemento estrogeno, con fenotipo di cellula epiteliale luminale (Lacroix M. 2004; Lacroix M. 2006).

Questa linea cellulare possiede diverse caratteristiche delle cellule dell'epitelio mammario differenziato, compresa la capacità di metabolizzare l'estradiolo per via dei recettori per gli estrogeni citoplasmatici. Le cellule MCF-7 sono ritenute linea cellulare di controllo estrogen-receptor (ER) positive (Levenson AS. 1997).

Inoltre in aggiunta alla sensibilità agli estrogeni, le MCF-7 sono ritenute sensibili anche alla citocheratina. Esse non sono recettive invece alla desmina, all'endotelina, al GAP, e alla vimentina. Quando si allestiscono colture cellulari *in vitro* (Fig. 5., Fig. 6.), le cellule sono in grado di formare dei tappeti monostratificati di cellule di natura epiteliale. Il TNF alpha (Tumor necrosis factor alpha) inibisce la crescita delle cellule MCF-7 in coltura. Inoltre trattamenti con anti-estrogeni modulano la

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

secrezione di fattori di crescita insulina-simili leganti proteine, il che ha effetto di ridurre la crescita cellulare.

Dal punto di vista genico, la linea cellulare MCF-7 non è stata mantenuta intatta negli anni. Infatti inizialmente, alla sua nascita, fu descritto un cariotipo contenente 85 cromosomi, questo è stato geneticamente manipolato e ridotto di 16 cromosomi. Attualmente la linea cellulare MCF-7 ha un cariotipo di 69 cromosomi.

Il tumore alla mammella è la forma di cancro più diffusa nelle donne dei paesi occidentali ad impatto industriale ed è la seconda causa di morte per tumore nelle donne.

Il carcinoma mammario inoltre presenta un'incidenza molto alta in Sardegna, una delle maggiori in Italia, calcolata come un caso ogni 40 soggetti.

Questo il motivo per cui si è ritenuto necessario fare sperimentazione su una linea cellulare che riproducesse tale tumore, al fine di capirne alcuni meccanismi. Le MCF-7 sono state individuate come ottimo modello sperimentale per lo studio di numerose terapie di natura farmacologica, prima di pensare all'applicazione sull'organismo umano (Lukyanova NY.). Le MCF-7 vengono utilizzate per testare diverse terapie applicate in diverse patologie tumorali (Charafe-Jauffret E.; Jian H.; Soule, HD.). L'epitelio ghiandolare è molto utile negli studi riguardanti i collegamenti con gli estrogeni e l'associazione cadmio-estrogeni, considerando la

capacità del cadmio di mimare gli effetti degli estrogeni legandosi ai recettori di membrana (De Pasquale J.; Ehlers EM.; Garcia-Morales P.).

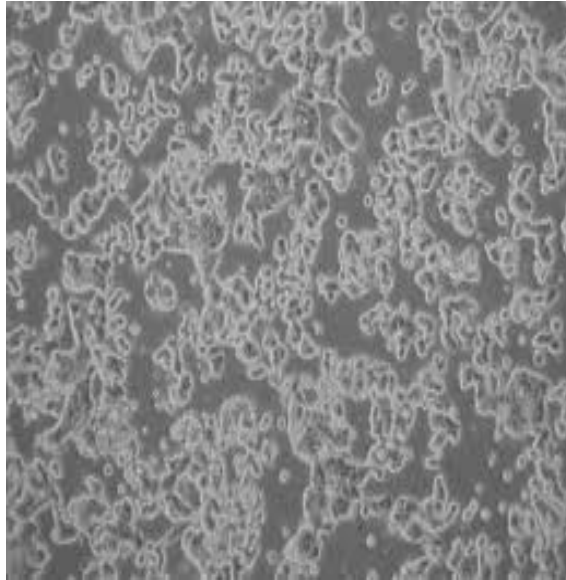


Fig. 5. MCF-7 in coltura.

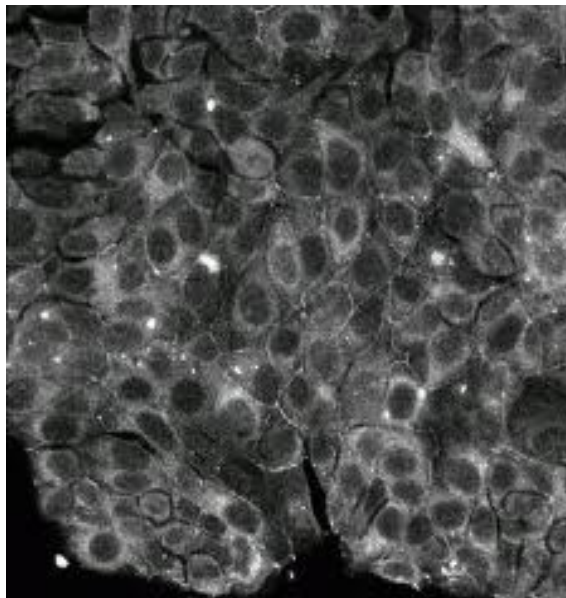


Fig. 6. MCF-7 in coltura

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

I.7 5-Fluorouracile

Le fluoropirimidine, specialmente il 5-Fluorouracile (5-FU), sono degli inibitori anti-metabolici di sintesi di nuove purine e pirimidine. Il 5-FU gioca un importante ruolo come chemioterapico ed è utilizzato nella clinica oncologica da circa 40 anni. Nella maggioranza dei protocolli standard per un ampio range di tumori solidi come il tumore al seno e il tumore colon-rettale, tumori allo stomaco, al fegato e al pancreas.

L'antimetabolita 5-FU è un analogo dell'Uracile, con un atomo di Fluoro nella posizione C5 dell'anello pirimidinico (Fig. 7.).

Il 5-FU è in grado di indurre una differenziazione nelle cellule tumorali umane, tuttavia è altamente tossico sia per le cellule tumorali che per le cellule normali (Marchal JA. 2000).

È un farmaco che agisce in vivo. Con tri-fosforilazione entra nell'RNA, alterandolo. Il principio attivo inibisce la timidilato sintetasi. Questa trasferisce un metile da un donatore a un accettore, cioè dal N5-N10 metilentetraidrofolic al 5-fluorouracile. L'enzima tende a strappare il fluoro ma rimane nel complesso ternario i cui componenti sono: 5-fluorouracile, timidilato sintetasi e 5-10 metilentetraidrofolic. Il complesso è tanto più stabile quando gli viene associato l'acido folinico, precursore del 5-10 metilentetraidrofolic. Si può somministrare per via endovenosa, bolo e la sua tossicità è in funzione alla sua via di somministrazione. Si può però creare una forma di farmaco resistenza, dovuta a iperproduzione o modifica della cellula bersaglio. Si va incontro

Autore: Yolande Asara

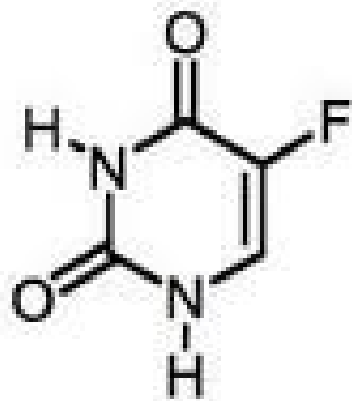
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

ad una diminuzione di enzimi attivanti e modificazione della timidilato sintetasi.

Inoltre nella terapia *in vivo* sul paziente oncologico si hanno numerosi effetti collaterali, tra i quali nausea, vomito, diarrea, mucositi, problemi gastrointestinali e la sindrome *hand foot*, che consiste nell'arrossamento di mani e piedi.

Il 5-FU viene metabolizzato a livello epatico ed eliminato per via renale. Ha un'emivita molto breve, di alcuni minuti, perciò nella sperimentazione *in vitro* su cellule MCF-7, si rende necessario ripetere i trattamenti con scadenze regolari (Marchal JA. 2004; Marchal 2007).



5-fluorouracile

Fig. 7. 5-Fluorouracile

I.7 MCF-7, Cd, 5-FU

L'allestimento di modelli *in vitro* con le linee cellulari di carcinoma mammario MCF-7 ha permesso di approfondire lo studio dei meccanismi di citotossicità correlati al Cadmio (Cd) presente in varie situazioni ambientali, ad esempio contaminazione in ambienti di lavoro e fumo di sigaretta e ad un chemioterapico quale il 5 Fluorouracile (5FU) ed il carcinoma mammario. Le indagini biomolecolari sono state svolte tramite studi di espressione differenziale di geni, utilizzando la metodica della Real Time Pcr, di proteine, utilizzando la metodica del Western Blot, coinvolti nell'apoptosi e nel ciclo cellulare. Inoltre si sono ricercate alterazioni nell'organizzazione ultrastrutturale, con la microscopia elettronica a Scansione e a Trasmissione (SEM, TEM) della cellula e l'organizzazione citoscheletrica studiando le proteine Actina e Tubulina, con la tecnica dell'immunofluorescenza. E' stato inoltre effettuato uno studio morfo-funzionale sulle linee cellulari trattate, per valutare gli effetti sulle proteine citoscheletriche. Le proteine del citoscheletro hanno un'importante ruolo nel sostegno strutturale e nell'organizzazione del citoplasma cellulare. Come riportato in letteratura, le cellule trattate con agenti tossici subiscono importanti modifiche nell'organizzazione citoscheletrica (Ehlers EM.; Liu Y.; Madeddu R. 2005;). Per questa ragione è stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza per osservare le alterazioni citoscheletriche e correlarle con i risultati dell'espressione genica e proteica sul ciclo cellulare e apoptotico.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

L'integrazione dei dati ottenuti dallo studio hanno migliorato la nostra comprensione dell'interazione dei metalli ed in particolare del Cadmio con la fisiologia cellulare e le possibili implicazioni nell'insorgenza del carcinoma mammario, in associazione ad un trattamento con 5-FU.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

OBIETTIVI

Autore: Yolande Asara
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7:
analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.
Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

I.OBIETTIVI

Un'esposizione cronica ai metalli rappresenta un importante fattore di rischio nell'insorgenza di tumori nella popolazione; d'altronde l'utilizzo di chemioterapici quale il 5FU nelle terapie antitumorali è piuttosto invasiva sul paziente clinico.

L'esposizione al cadmio potrebbe avere un ruolo chiave nell'insorgenza e nella progressione del carcinoma mammario, essendo un importante antagonista degli estrogeni.

L'obiettivo che mi sono prefissata in questa tesi è stato quello di capire come e quanto il Cd induca modificazioni ultrastrutturali oltre che di espressione genica e proteica, dovute ad interazioni con i recettori per gli estrogeni, nei modelli *in vitro*. I risultati di questo studio, con messa a punto di condizioni sperimentali in cui sono state stabilite concentrazioni di Cd utili a contrastare la vitalità della cellula tumorale, potrebbero essere utili nella prospettiva dell'applicazione *in vivo* su animali da laboratorio e in futuro su pazienti clinici in terapia per tumore mammario.

Inoltre il Cd interagisce con il 5FU, era quindi mia intenzione analizzare in che modo le interazioni tra Cd e 5FU e i processi metabolici della cellula agiscano come cofattori nella patogenesi del tumore mammario, essendo il 5FU molto utilizzato nella terapia tradizionale del tumore in questione. Un obiettivo importante era quello di mettere a punto un protocollo con condizioni sperimentali tali per cui le concentrazioni di

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Cd e 5FU fossero in grado di rallentare la differenziazione delle neoplasie estrogeno dipendenti come quella del carcinoma mammario. Per questo, ho condotto uno studio su un modello *in vitro* su linee cellulari come base per studi di patogenicità, espressione genica, proteica, ciclo cellulare e apoptosi. Lo scopo di questa tesi era determinare l'importanza delle interazioni tra il Cd ambientale e un antitumorale quale il 5-FU, da un punto di vista morfologico, di espressione genica e di espressione proteica.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

MATERIALI E METODI

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

I.MATERIALI E METODI

III.1 Allestimento Colture cellulari MCF7 *in vitro*

Le cellule MCF7 sono state coltivate con terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO, NY, USA) complementato con 10% FBS, 2.0 mmol/L glutamina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina. Le cellule sono state incubate a 37°C con 5% CO₂; quindi espanse per alcuni giorni sino a raggiungimento di confluenza in fiasche T75 per colture cellulari.

Quindi le cellule sono state trattate con Tripsina - EDTA (Invitrogen) e seminate in piastre multiwell da 24 pozzetti per la preparazione del campione allo studio di immunofluorescenza e allo studio di microscopia elettronica a scansione (SEM), e in fiasche T75 per la preparazione del pellet cellulare per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM); per la preparazione all'analisi dell'espressione genica e proteica, le cellule sono state coltivate in multiwell da 24 pozzetti ove sono state trattate con le combinazioni di concentrazioni di Cd e 5-FU messe a punto dal protocollo sperimentale.

Le cellule sono state trattate con 5-Fluouracile (5-FU) e Cadmium Chloride (CdCl₂), (Sigma-Aldrich), con differenti combinazioni di concentrazioni e punti tempo sperimentali (Tabella 1., Tabella 2.). Cellule MCF-7 coltivate in maniera parallela e non trattate sono state utilizzate come controllo. Per ogni esperimento, la "stock solution" è

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

stata preparata in DMSO e conservata a -20°C , quindi diluita a fresco nel terreno di coltura per ottenere la soluzione di lavoro alle concentrazioni desiderate.

Tabella 1. Tempi e concentrazioni MCF-7 condizioni sperimentali - Analisi TEM, SEM, Immunofluorescenza.

	Concentrazioni	PuntoTempo
Ctrl	-	24h, 48h
Cd	5 μM , 20 μM	24h, 48h
5-Fu	1,5 μM , 50 μM	24h, 48h
Cd + 5-Fu	Cd 5 μM , Cd 20 μM + 5-Fu 1,5 μM , 5-Fu 50 μM	24h, 48h

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Tabella 2. Tempi e concentrazioni MCF-7 condizioni sperimentali –
Analisi Espressione Genica e Proteica.

	Concentrazioni	PuntoTempo
Ctrl	-	6h, 24h, 48h
Cd	3 μ M	6h, 24h, 48h
5-Fu	1,5 μ M	6h, 24h, 48h
Cd + 5-Fu	Cd 3 μ M+ 5-Fu 1,5 μ M	6h, 24h, 48h
Cd + 5-FU dopo ½ tempo dall'inizio dell'esperimento	Cd 3 μ M+ 5-Fu 1,5 μ M dopo ½ tempo	6h, 24h, 48h
5-FU + Cd dopo ½ tempo dall'inizio dell'esperimento	5-Fu 1,5 μ M + Cd 3 μ M dopo ½ tempo	6h, 24h, 48h

III.2 Test di citotossicità *in vitro*

Gli effetti del Cd e del 5-FU sulla vitalità cellulare, sono stati testati usando la sulforhodamine-B colorimetric assay. Sospensioni cellulari di MCF-7 (1×10^3 cells/well) sono state seminate in multiwell da 24 pozzetti e incubate per 24h. Le cellule sono quindi state trattate con differenti concentrazioni di Cd e 5-FU nel mezzo di coltura. Tre giorni più tardi, il medium di coltura è stato aspirato, è stato ripristinato medium

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

fresco e effettuato il trattamento con Cd e 5-FU, quindi le cellule sono state mantenute per altri tre giorni (Villalobos M.). Le cellule sono state a questo punto processate, usando un Titertek Multiscan apparatus (Flow, Irvine, California) at 492 nm. Abbiamo avuto modo di valutare la linearità del SRB assay con una quantità nota di cellule in sospensione all'inizio dell'esperimento. La valutazione del valore del IC₅₀, sia per il Cd che per il 5-FU, è stato calcolato con una curva semi logaritmica dose-response con interpolazione lineare. Ogni esperimento è stato ripetuto tre volte e analizzato in doppio.

Per ogni esperimento abbiamo utilizzato differenti concentrazioni e punti tempo, come da Tabella 1. e da Tabella 2.

III.3 Analisi morfostrutturale, Microscopia Elettronica

III.3.1 Microscopia a Trasmissione TEM

La coltura cellulare è stata portata a confluenza in T75 e trattata con Cd (5µM, 20µM, 40µM) e 5-FU (1.5µM, 50µM) per i differenti “punto tempo” (24h, 48h) (Tabella 1.), quindi staccata e il “pellet cellulare” chimicamente fissato con 2% glutaraldeide in cacodylate buffer per 2 h. Sono stati effettuati tre lavaggi di 15 minuti ciascuno, nello stesso buffer. A questo punto le cellule sono state post fissate in 1% di tetrossido di Osmio (OsO₄) per 1 h; le cellule sono state lavate con il buffer di

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

preparazione e H₂O distillata dopo di che è stata effettuata l'inclusione in 1.5% "low-melting-point agarose".

Avvenuta la gelificazione dell'agarosio, i "blocks" (1mm x 1mm) sono stati sezionati.

I blocks" cellulari sono quindi stati deidratati in ETOH e inclusi in Spurr's low-viscosity resin, sono state effettuate delle sottili sezioni. I campioni sono poi stati trattati con 4% di acetato di uranile e citrato di piombo.

Le sezioni preparate con LKB-8800 ultratome, sono state esaminate e fotografate con un Zeiss 902 electron microscope a 80 kV (Fig. 8.).



Fig. 8. Zeiss 902 electron microscope.

III.3.2 Microscopia a Scansione SEM

Le cellule sono state preparate e trattate con Cd ($5\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$, $40\mu\text{M}$) e 5-FU ($1.5\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$) per i differenti “punto tempo” (24h, 48h) (Tabella 1.) in multiwell da 24 pozzetti, su vetrini trattati per colture cellulari. Dopo i prestabiliti tempi di incubazione, le cellule sono state fissate in glutaraldeide al 2,5% in phosphate buffer saline (PBS) per 90 minuti a 4°C , sono stati effettuati tre lavaggi da 5 minuti in Ringer solution, dopo di che le cellule sono state post fissate in 1% di tetrossido di Osmio

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

(OsO₄) per 2 h; quindi sono stati effettuati tre lavaggi di 5 minuti in H₂O sterile. A questo punto è stato seguito il protocollo per la deidratazione in ETOH (25% per 20 minuti, 50% per 20 minuti, 75% per 20 minuti, 95% per 20 minuti, 100% per 60 minuti) e quindi l'immersione in hexamethyldisilazane (per 10 minuti) (Bell SW.; Forge A.), infine i campioni sono stati esaminati e fotografati in low vacuum ESEM (environmental scanning electron microscope) sia SEM FEI Inspect S che Quanta 200 (Fig. 9.).



Fig. 9. Low Vacuum SEM FEI.

III.4 Immunofluorescenza

III.4.1 Studio delle proteine del citoscheletro: Actina e Tubulina

Le cellule sono state seminate su multiwell da 24 pozzetti preparate con vetrini trattati per colture cellulari (round cover slip da 12mm), trattate con Cd (5 μ M, 20 μ M, 40 μ M) e 5-FU (1.5 μ M, 50 μ M) per i differenti “punto tempo” (24h, 48h) (Table 1.), quindi sono state fissate con formaldeide al 4%. Le membrane cellulari sono state permeabilizzate con triton allo 0,2% e saturate con albumina di siero bovino (BSA) al 1%.

Per lo studio della Tubulina le cellule su vetrino sono state incubate per un ora con un anticorpo monoclonale anti-Tubulina monoclonale (Sigma-Aldrich) e coniugate con un anticorpo secondario Ab anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich).

Per lo studio della Actina, le cellule sono state incubate con TRITC-Phalloidin coniugated (Sigma-Aldrich). I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Infine i vetrini sono stati montati su vetrini porta oggetto con mowiol e osservati con microscopia a fluorescenza.

E' stato usato un microscopio a fluorescenza Olympus BX61 (obbiettivo UplanApo 100x/1,35oil/iris, obbiettivo UplanApo 40x/0,75) con digitale B/W camera FViewII (Soft Imaging System) e analizzato con Cell software (CELL[^]P ver 1.20 Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Munster, Germany).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

III.5 Studio espressione genica

Le concentrazioni di Cd e 5-FU utilizzate in quest'esperimento sono corrispondenti a quelle del Ic_{50} [Cd 3 μ M; 5-FU 1,5 μ M], le condizioni sperimentali sono quelle descritte in Tabella 2. Le cellule sono state coltivate con per diversi "punti tempo" (6h, 24h, 48h), con aggiunta di solo Cd, aggiunta di solo 5-FU, aggiunta di Cd e 5-FU contemporaneamente, aggiunta di 5-FU a cellule pretrattate con Cd dopo metà tempo dall'inizio dell'esperimento, e aggiunta di Cd a cellule pretrattate con 5-FU dopo metà tempo dall'inizio dell'esperimento. Colture di cellule MCF7 non trattate sono state utilizzate come linea di controllo.

III.5.1 Estrazione Rna e retro trascrizione in cDna

Alla fine dell'esperimento le cellule sono state lavate con PBS, quindi l'RNA è stato estratto con Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA) (metodo "Chomzynski e Sacchi"), secondo le manufacturer's instruction. L'RNA in quantità di 1 μ g, è stato retrotrascritto con MMLV (Invitrogen, CA, USA) in cDNA, secondo le manufacturer's instruction.

III.5.2 Real Time Pcr con Sybr Green

Il cDNA è stato quantificato con il metodo della Real Time Pcr, utilizzando Sybr Green come fluorophor (Sybr Mix Invitrogen) e strumento iCycler Biorad.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

La mix di reazione (di 50 μ l totali) era così composta: 25 μ l di Sybr Mix Invitrogen, 2 μ l di reverse and forward primers (10pmol/ μ l) concentrazione finale 400nM, e 5 μ l di campione di cDna. Amplificazione di 50 cicli totali, denaturation step a 94°C per 15s, 55°C per 30s e 60°C per 30s, con lettura di fluorescenza alla fine di ogni step.

Tutti i primers utilizzati in questo studio sono stati sintetizzati dalla Lyfe Technology (Tabella 3.). Si è analizzata una batteria di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nel ciclo apoptotico quali: Bcl-2: gene antiapoptotico; P53: gene tumor suppressor; Bax: gene proapoptotico; Caspase-8: gene proapoptotico; Caspase 9: gene proapoptotico; C-Myc: protooncogene; Cyclin D1: checkpoint in fase G1/S del ciclo cellulare; Cyclin A1: checkpoint in fase G2/M del ciclo cellulare; GAPDH: gene costitutivo, “house keeping gene”, gene di riferimento utilizzato per la normalizzazione.

Critical threshold (Ct) cycle numbers sono stati ottenuti con l’amplificazione di Bcl2, P53, Bax, Caspase 8, Caspase9, C-Myc, CyclinD1, Cyclin A1 and GAPDH, e i delta threshold cycle (DCt) values sono stati calcolati sottraendo i valori dei Ct del GAPDH (house keeping gene) e ogni target gene. Il campione di mRNA è stato quindi normalizzato sui livelli di espressione del GAPDH mRNA.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Tabella 3. Geni investigati con Real Time Rt-Pcr

<ul style="list-style-type: none"> • Bcl-2: antiapoptotic gene (Bax inhibitor)
<hr/> Forward: 5'-TGGTGGTTTGACCTTTAGAGA-3' Annealing Temperature 55°C
Reverse: 5'-AGGTCTGATCATTCTGTTC-3'
<ul style="list-style-type: none"> • P 53: tumor suppressor gene
<hr/> Forward: 5'-GGCATTCTGGGAGCTTCATCT-3' Annealing Temperature 58,5°C
Reverse: 5'-CCCAAGCAATGGATGATTGA-3'
<ul style="list-style-type: none"> • Bax: proapoptotic gene(caspase-9 activator)
<hr/> Forward: 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' Annealing Temperature 55°C
Reverse: 5'-GGCGGCAATCATCCTCTG-3'
<ul style="list-style-type: none"> • Caspase-8: proapoptotic gene
<hr/> Forward: 5'-AGGAGGAGATGGAAAGGGA ACTT-3' Annealing Temperature 55°C
Reverse: 5'-ACCTCAATTCTGATCTGCTCACTTCT-3'
<ul style="list-style-type: none"> • Caspase-9: proapoptotic gene
<hr/> Forward: 5'-CCTCAA ACTCTCAAGAGCAC-3' Annealing Temperature 58,5°C
Reverse: 5'-GAGTCAGGCTCTTCCTTTG-3'

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
 Università degli Studi di Sassari

- **C-Myc:** protooncogene

Forward: 5'-GGACGACGAGACCTTCATCAA-3'

Annealing Temperature 55°C

Reverse: 5'-CCAGCTTCTCTGAGACGAGCTT-3'

- **Cyclin D1:** checkpoint in G1/S phase of cellular cycle

Forward: 5'-CCGTCCATGCGGAAGATC-3'

Annealing Temperature 55°C

Reverse: 5'-ATGGCCAGCGGGAAGAC-3'

- **Cyclin A1:** checkpoint in G2/M phase of cellular cycle

Forward: 5'-GCACCCTGCTCGTCACTTG-3'

Annealing Temperature 55°C

Reverse: 5'-AGCCCCCAATAAAAGATCCAG-3'

- **GAPDH:** housekeeping gene. It was utilized like a control gene to normalized some variation of quantity and retrotranscription efficacy of mRNA.

Forward: 5'-CAAGGAGTAAGACCCCTGGAC -3'

Annealing Temperature 58,5°C

Reverse: 5'-TCTACATGGCAACTGTGAGGAG -3'

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso

Università degli Studi di Sassari

III.6 Studio espressione proteica

Le cellule dopo essere state preparate in multiwell da 6 pozzetti, sono state trattate secondo le condizioni sperimentali descritte in Tabella 2. corrispondenti a quelle utilizzate per lo studio dell'espressione genica. Le cellule sono state coltivate per diversi "punti tempo" (6h, 24h, 48h), con aggiunta di solo Cd, aggiunta di solo 5-FU, aggiunta di Cd e 5-FU contemporaneamente, aggiunta di 5-FU a cellule pretrattate con Cd dopo metà tempo dall'inizio dell'esperimento, e aggiunta di Cd a cellule pretrattate con 5-FU dopo metà tempo dall'inizio dell'esperimento. Colture di cellule MCF7 non trattate sono state utilizzate come linea di controllo.

III.6.1 Estrazione delle proteine

Alla fine dell'esperimento, è stato rimosso il terreno di coltura e utilizzato un buffer di lisi (60 mM Tris/HCl (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) per la lisi cellulare. A questo punto le cellule lisate sono state raccolte con una pipetta in provette eppendorf e stoccate a -20°C.

Per continuare l'esperimento e estrarre le proteine, i campioni congelati sono stati scongelati e incubati (in bagnetto ad acqua) per 10 minuti a 96°C. Sono state così estratte 20 µg di proteine per campione, poi analizzate con SDS-PAGE (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

III.6.2 Western Blot

Le proteine, 20 µg per campione, sono state analizzate con SDS-PAGE (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis) in un Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA) a 60 mA per 3 ore a temperatura ambiente.

Le proteine sono state trasferite per elettroforesi su una membrana di nitrocellulosa, per 45 minuti con una corrente di 20 V a temperatura ambiente.

Si è quindi fatto un lavaggio della membrana di nitrocellulosa con Ponceau staining, poi due lavaggi da 10 minuti in agitazione in PBS, trattamento con blocking solution (PBS, 5% non-fat milk) per 1 h a temperatura ambiente; 3 lavaggi da 10 minuti con PBS; quindi incubazione con anticorpo primario, diluito in PBS con 5% di non-fat dry milk, over/night a 4°C in agitazione. Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in PBS, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario per 1h, hanno fatto seguito lavaggi.

Sono state studiate le proteine corrispondenti a geni analizzati con lo studio dell'espressione genica: Bcl-2, P53, Caspase-8, C-Myc, Cyclin D1, Cyclin A1, e Beta Actina utilizzata come proteina costitutiva di riferimento.

Le bande sono state visualizzate usando un ECL system (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

RISULTATI

Autore: Yolande Asara
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7:
analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.
Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

IV.RISULTATI

IV.1 Test di citotossicità *in vitro*

Al fine di stimare la citotossicità di Cd e 5-FU nella linea cellulare di tumore mammario MCF-7, abbiamo usato il metodo SRB staining. L'IC₅₀, viene definito come la concentrazione di droga sufficiente ad avere una morte cellulare del 50% in relazione alle cellule non trattate. Il valore dell'IC₅₀ per il Cd era di $5 \pm 0.25 \mu\text{M}$ per 5-FU $1.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$.

IV.2 Microscopia elettronica a trasmissione e a scansione SEM-TEM

L'analisi morfologica al TEM hanno mostrato delle cellule di controllo MCF-7 polimorfe. Il nucleo ha una posizione centrale, possiede uno o due nucleoli prominenti e una membrana nucleare ben definita. Gli organuli citoplasmatici appaiono ben definiti, sono presenti numerosi mitocondri di aspetto globulare con evidenti creste lamellari. Inoltre la superficie cellulare è caratterizzata da un'alta densità di microvilli membranosi. Al SEM le cellule appaiono di forma variabile, allungate e poligonali con numerose e sottili estroflessioni membranose e un accresciuto numero di filopodia (Fig. 10. a, b, c).

IV.2.1 Cd

Nelle cellule trattate con solo Cd a basse concentrazioni ($5\mu\text{M}$) e per brevi periodi di tempo di incubazione (24 hours) si è osservata un'intensa

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

attività metabolica e presenza di un maggior numero di mitocondri di aspetto globulare di maggiori dimensioni con creste dilatate sottili e numerose. Sono stati inoltre osservati dei depositi di glicogeno accumulate in clusters.

I nuclei cellulari presentavano una fine cromatina dispersa e uno o due grossi nucleoli, localizzati in periferia nucleare (Fig. 11. a).

La superficie delle cellule trattate con a basse concentrazioni di Cd osservata al SEM, mostrava una struttura simile a quella delle cellule di controllo, con corti microvilli numerosi e presenza di poche vescicole citoplasmatiche (Fig. 11. b).

Ad alte concentrazioni di Cd (20 μ M) e 24 ore di trattamento, i nuclei erano più evidenti e si mostravano in posizione laterale vicino alla membrana cellulare. Sono state individuate numerose vescicole citoplasmatiche, numerosi mitocondri con creste lamellari con alterazioni strutturali. Le vescicole citoplasmatiche si trovavano in prossimità del plasmalemma e si vedevano segni di esocitosi. Inoltre abbiamo osservato una riduzione dei filopodi di superficie cellulare, sebbene in presenza di condizioni estreme, con concentrazioni di Cd a 40 μ M per 48h di trattamento, i filopodi tendono ad aumentare significativamente di numero ed è osservabile una forte morte cellulare. E' stato visto un gran numero di vescicole citoplasmatiche di misure variabili e le cellule sono apparse maggiormente tondeggianti e meno adese alla piastra di coltura.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

IV.2.2. 5-FU

Il 5-FU ha indotto un effetto citotossico nelle cellule MCF-7, mostrando un citoplasma integro per poco tempo dopo l'inizio del trattamento, con comparsa di un accresciuto numero di vescicole distese e mitocondri rigonfi con parziale perdita delle creste lamellari. I componenti organolettici della cellula mostravano evidenti segni di degenerazione. I nuclei si presentavano privi di nucleoli e la cromatina nucleare era addensata in granuli posizionati in prossimità della membrana nucleare (Fig. 11. c). Dall'analisi al SEM si osservava che le cellule trattate con 5-FU erano di aspetto piuttosto allungato e diventavano maggiormente irregolari. Inoltre erano presenti nel tappeto cellulare numerosi spazi intercellulari. Tuttavia ciò che colpisce maggiormente è il fatto che fossero presenti delle alterazioni di membrana simili a fori, assenti sia nelle cellule MCF-7 di controllo che nelle cellule trattate con Cd. Abbiamo osservato cellule più rotondeggianti e meno adese alla superficie della piastra di coltura (Fig. 11. d).

IV.2.3. Cd + 5-FU

L'aggiunta di 5-FU alle cellule trattate con Cd (5 μ M- 20 μ M) non ha indotto significative alterazioni ultrastrutturali rispetto alle cellule trattate con Cd solo.

Nelle cellule trattate con Cd 40 μ M, portate a condizioni estreme, si ha forte accrescimento di morte cellulare.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Nelle cellule trattate con Cd+5FU sono stati evidenziati numerosi mitocondri di aspetto globulare, con presenza di creste mitocondriali regolari.

I nuclei presentavano forme regolari con cromatina dispersa e presenza di uno o due nucleoli. Tutto ciò ad indicare un sistema cellulare con una buona attività metabolica.

L'osservazione al SEM ha messo in evidenza delle cellule con superficie membranosa appiattita e presenza di corti filopodi (Fig. 11. e, f), che dopo 48 ore dal trattamento si accorciavano e avevano tendenza a scomparire.

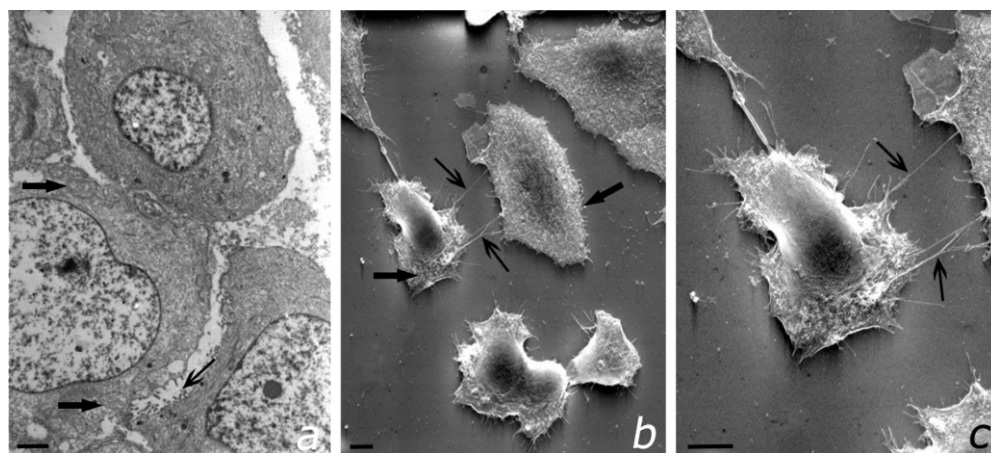


Fig.10. a): TEM 3000X, MCF-7 controllo; nelle cellule di aspetto polimorfo, si osservano numerosi mitocondri di aspetto globulare con creste lamellari nelle cellule, (freccia spessa) e microvilli (freccia sottile). b): SEM 3000X, MCF-7 controllo; evidente aspetto polimorfo di cellule ricche in microvilli (freccia spessa) e lunghi filopodi (freccia sottile). c): dettaglio di b), MCF-7 controllo, filopodi messi in evidenza (freccia sottile). Barra: 5 μ m.

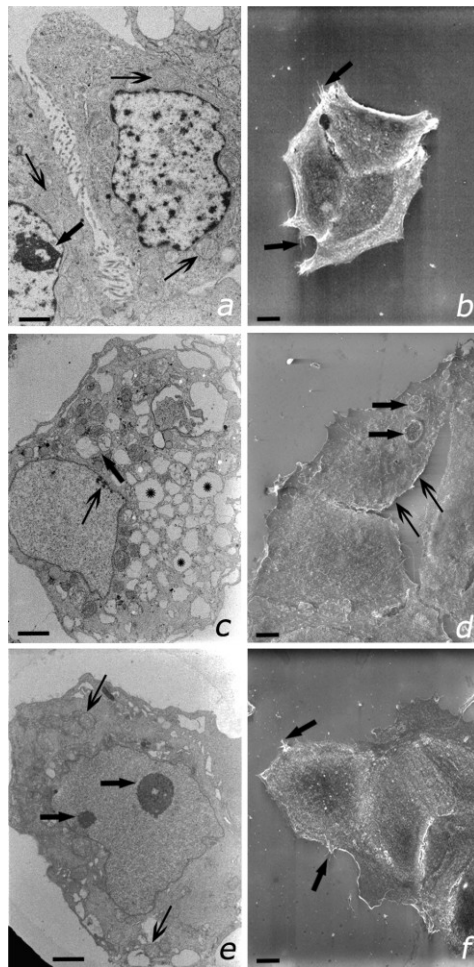


Fig.11. a): TEM 3000X, MCF-7+Cd 5 μ M-24h nucleo indentato con cromatina dispersa e nucleoli in posizione periferica (freccia spessa), numerosi mitocondri con creste dilatate (freccia sottile). b): SEM 3000X, MCF-7+Cd 5 μ M-24h; microvilli superficiali con alcuni prolungamenti di grandi dimensioni (freccia spessa); c): TEM 3000X, MCF-7+5-FU 1,5 μ M-24h; numerose vescicole non elettro-dense (asterisco), mitocondri globulosi con aumentato numero di creste lamellari (freccia spessa), nel nucleo sono presenti piccole aree di eterocromatina in prossimità della membrana (freccia sottile) e i nucleoli

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

non sono più visibili. d): SEM 3000X, MCF-7+5-FU 1,5 μ M-24h; le cellule, di aspetto irregolare, mostrano alterazioni della membrana (freccia spessa) e lasciano spazi intercellulari nel tappeto di MCF-7 sul vetrino “round cover slip” di coltura (freccia sottile). e): TEM 3000X, MCF-7+Cd 20 μ M+5-FU 1,5 μ M-24h; nuclei indentati con due nucleoli (freccia spessa), mitocondri di aspetto globulare (freccia sottile). f): SEM 3000X, MCF-7+Cd 20 μ M+5-FU 1,5 μ M-24h; cellule di contorni più regolari con corti e sottili prolungamenti membranosi (freccia spessa). Barra: 5 μ m.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

IV.3 Immunofluorescenza, Tubulina e Actina

Nelle cellule MCF-7 di controllo sia l'Actina che la Tubulina apparivano ben distribuite nel citoplasma cellulare, con una fine organizzazione di struttura filamentosa (Fig. 12. a, b, c).

IV.3.1. Cd

Nelle cellule trattate con Cd (5 μ M and 20 μ M) per 24 ore, la Tubulina non andava incontro a cambiamenti strutturali e rimaneva ben distribuita sia nella regione nucleare che nella regione citoplasmatica (Fig. 12. d, e, f, g, h, i). Invece la fine struttura filamentosa dell'Actina appariva alterata, i fasci di Actina filamentosa si addensavano trasformando l'Actina filamentosa in Actina globulosa sino ad organizzarsi in così detti "smeared patches". Questa situazione è stata osservata dopo un breve tempo di incubazione con Cd 5 μ M (Fig. 12. d, e, f) ed è risultata più accentuata con esposizione cellulare con concentrazioni di Cd a 20 μ M. Alte concentrazioni di Cd hanno indotto una forte ed evidente espressione dell'Actina in prossimità della membrana plasmatica. La Tubulina invece, in particolar modo nelle cellule MCF-7 trattate con Cd 20 μ M, è apparsa concentrata a livello perinucleare, mostrando alla microscopia una forte emissione di fluorescenza in questa regione, con diramazione di matrice filamentosa per tutto il citoplasma cellulare sino a raggiungere la membrana plasmatica (Fig. 12. g, h, i). Le cellule trattate

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

con Cd 40 μ M, come già detto precedentemente, mostravano un'accresciuta morte cellulare.

IV.3.2. 5-FU

Nelle cellule trattate con 5-FU l'Actina è apparsa meno organizzata e filamentosa. I filamenti di Tubulina si mostravano organizzati a formare una fitta rete intorno alla membrana nucleare (a canestro), dalla quale non si avevano diramazioni filamentose per il resto del citoplasma sino a raggiungere la membrana plasmatica. Non sono state evidenziate differenze significative tra le 24 e le 48 ore di trattamento (Fig. 13. a, b, c).

IV.3.3. Cd + 5-FU

Nelle cellule MCF-7 trattate con Cd (5 μ M-20 μ M) + 5-FU per 24 ore, l'Actina era meno filamentosa se comparata a quella osservata nelle cellule MCF-7 di controllo; inoltre la proteina era distribuita in maniera più organizzata rispetto a quella delle cellule trattate con solo Cd. La Tubulina aveva aspetto e distribuzione simile sia a quella delle cellule di controllo che a quelle trattate con Cd (Fig. 13. d, e, f).

Nelle cellule trattate con Cd (5 μ M-20 μ M) + 5FU per 48 ore, l'Actina andava progressivamente disgregandosi, mentre la Tubulina si manteneva una struttura filamentosa stabile e ordinata (Fig. 13. g, h, i).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

L'associazione di Cd e 5-FU ha indotto meno alterazioni strutturali sia nell'Actina che nella Tubulina rispetto alle altre condizioni sperimentali. In condizioni estreme (Cd 40 μ M, 48h), l'aggiunta di 5-FU non ha modificato significativamente il disordine cellulare osservato nelle cellule trattate con solo Cd.

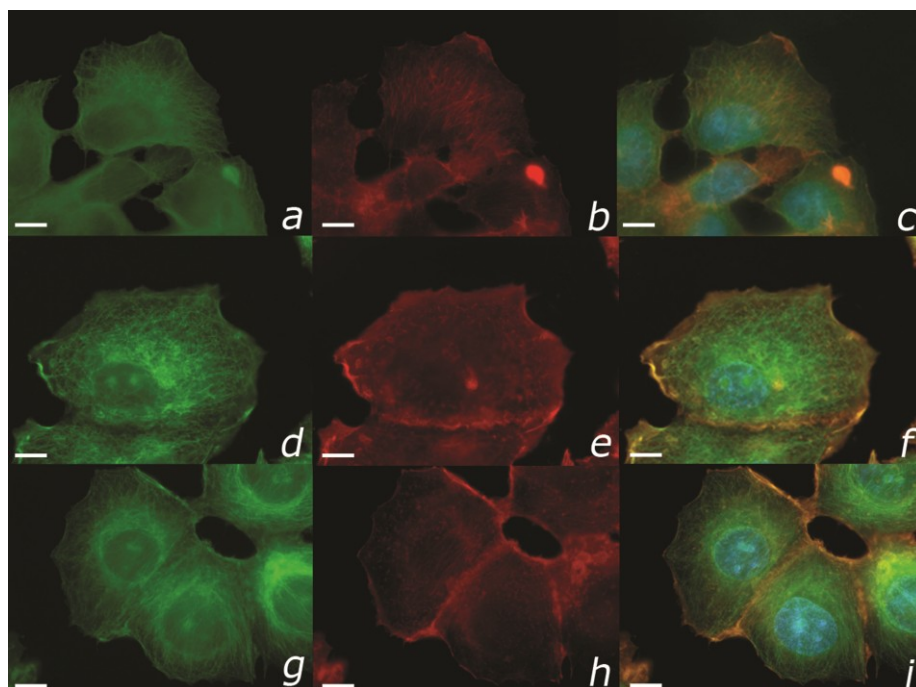


Fig. 12. MCF-7 100X: a, b, c) - controlli (Tubulin-FITC, Phalloidin-TRITC, Merge) Tubulina and Actina erano organizzate in strutture filamentose ed erano regolarmente distribuite nel citoplasma plasmatico; d, e, f) - Cd 5 μ M-24h (FITC, TRITC, Merge); g, h, i) - Cd 20 μ M-48h (FITC, TRITC, Merge). La Tubulina era omogeneamente distribuita dalla membrane nucleare alla membrane plasmatica. L'Actina era costituita da fasci filamentosi di Actina F e "smeared patches" di Actina G. Barra: 5 μ m.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

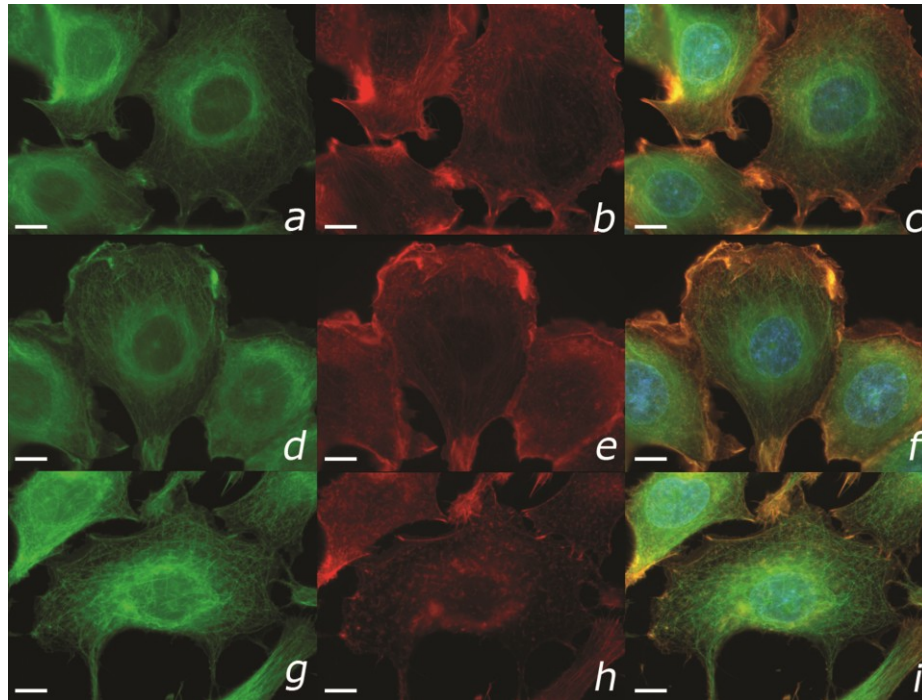


Fig. 13. MCF-7 100X: a, b, c) - 5-FU 1,5µM-48h (FITC, TRITC, Merge) l'Actina era meno organizzata e filamentosa, la Tubulina mostrava un alone regolare a canestro intorno alla membrane nucleare; d, e, f) - Cd 5µM + 5-FU 1,5µM-24h (FITC, TRITC, Merge). L'Actina era meno filamentosa, tuttavia la sua distribuzione era migliorata se paragonata a quella delle cellule trattate con solo Cd. La Tubulina aveva un pattern di distribuzione simile a quello delle cellule di controllo e alle cellule trattate con solo Cd. g, h, i) - Cd 20µM+5-FU 1,5µM-48h (FITC, TRITC, Merge) l'Actina si stava progressivamente disgregando mentre la Tubulina manteneva una struttura stabile e ordinata. Barra: 5µm.

IV.4 Espressione Genica

Per quanto riguarda lo studio dell'espressione genica, è stato graficato il Fold of increase di ogni gene quantificato, normalizzando l'espressione genica delle cellule trattate su quella delle cellule MCF-7 di controllo (CTRL) alle quali è stato assegnato valore di espressione uguale a uno.

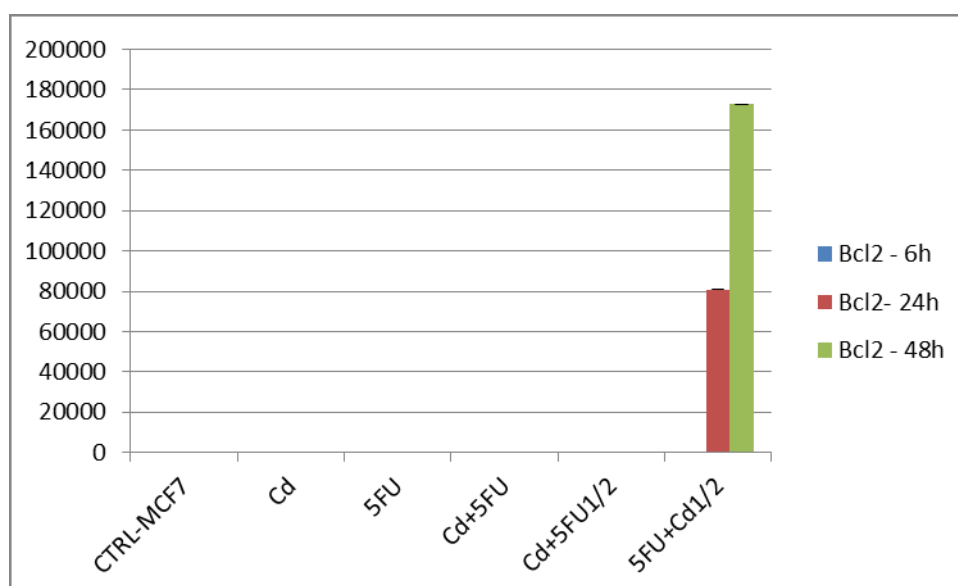


Fig.14. Fold of increase di Bcl2

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

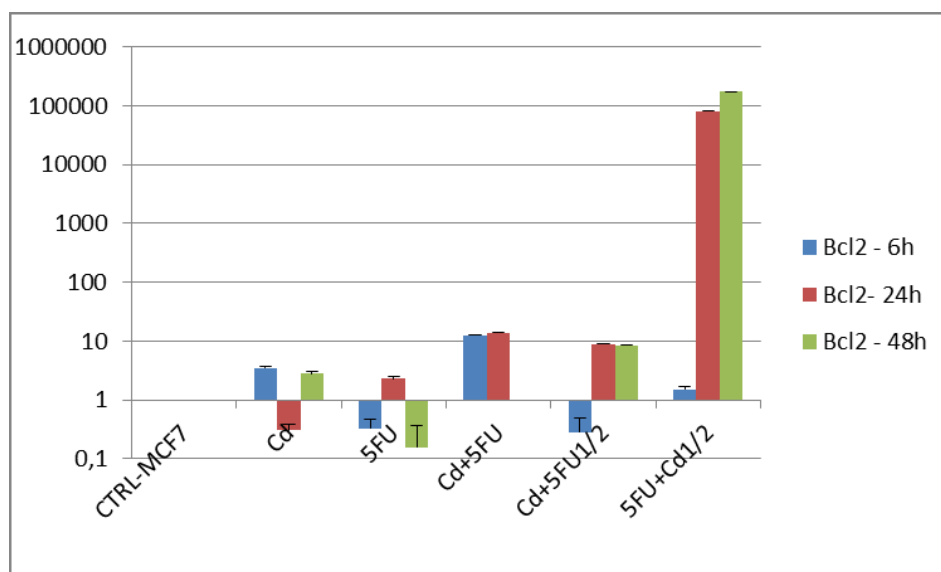


Fig.14 bis. In scala log 10. Fold of increase di Bcl2

Il gene Bcl2 (gene proapoptotico) è espresso in tutte le cellule trattate maggiormente rispetto a quelle di controllo. In particolare con Cd solo Bcl2 è circa cinque volte maggiore che nei CTRL alle 6 e alle 48h, con 5-FU è presente circa quattro volte più che nei CTRL alle 24h e con una sotto espressione (down regulation) genica sia precocemente alle 6h che tardivamente alle 48h; con Cd + 5-FU e con Cd + 5-FU $\frac{1}{2}$ tempo notiamo un incremento dell'espressione di circa 10 volte superiore alle MCF-7 di controllo. Il gene Bcl2 è significativamente espresso nel punto riguardante le cellule trattate preventivamente con 5-FU e addizione di Cd dopo metà tempo dall'inizio dell'esperimento, alle 24 ore l'espressione è di 80000 volte quella delle cellule di controllo, e a 48 ore l'espressione è di circa 170000 volte superiore a quella delle CTRL (Fig.14., Fig.14 bis.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

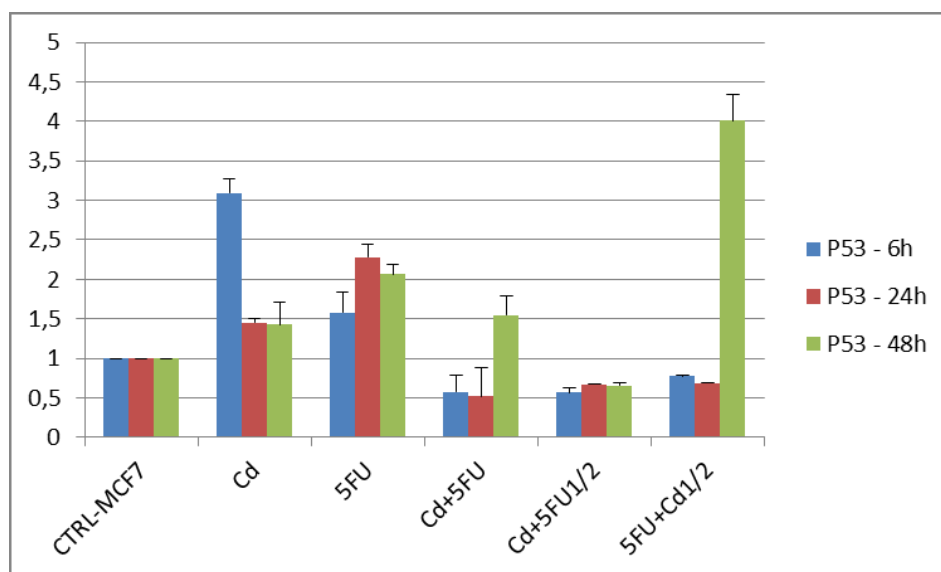


Fig. 15. Fold of increase di P53

Il gene P53 (tumor suppressor gene) è espresso nelle cellule trattate con solo Cd, due volte più che nei CTRL a 6h e 0,5 volte in più a 24 e 48h; nelle cellule trattate con 5-FU è espresso 0,6 volte in più a 6h, ed è il doppio a 24 e 48h; nelle cellule trattate con Cd e 5-FU, somministrati allo stesso tempo, si ha una sotto espressione rispetto ai CTRL a 6h e a 24h, mentre a 48h l'espressione è di 0,5 volte maggiore; l'espressione nel punto Cd più 5-FU dopo ½ tempo dall'inizio dell'esperimento mostra una sotto espressione genica rispetto ai CTRL; Nelle cellule trattate prima con 5-FU con aggiunta di Cd dopo metà del tempo dall'inizio dell'esperimento, si nota un'espressione inferiore ai CTRL a 6 e 24h, mentre a 48h l'espressione è maggiorata di 3 volte rispetto ai CTRL (Fig. 15.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

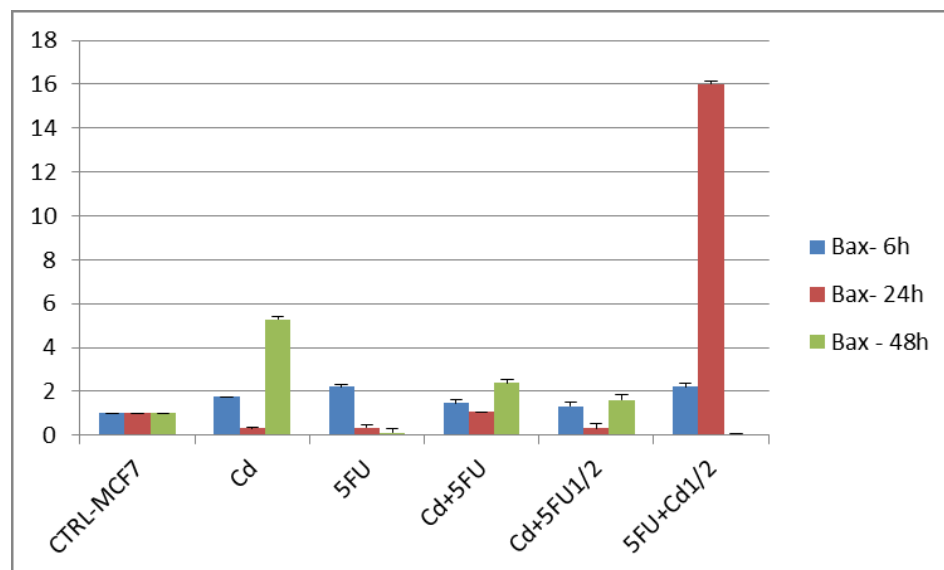


Fig. 16. Fold of increase di Bax

L'espressione del gene Bax (gene pro apoptotico) è superiore di quasi 5 volte rispetto ai CTRL nelle cellule trattate con Cd solo a 48 ore, leggermente più espresso a 6h e quasi assente a 24h; nelle cellule trattate con 5-FU l'espressione di Bax è poco più del doppio rispetto ai CTRL a 6h, è invece quasi inespresso a 24 e 48 ore; nelle cellule trattate con Cd più 5-FU si ha una significativa espressione del gene di poco più del doppio rispetto ai CTRL alle 48h; nel punto Cd più 5-FU dopo $\frac{1}{2}$ tempo dall'inizio dell'esperimento, non si ha una significativa espressione; nelle cellule pretrattate con 5-FU alle quali è stato aggiunto Cd dopo $\frac{1}{2}$ tempo dall'inizio dell'esperimento, osserviamo un'espressione del gene Bax di 15 volte superiore a quella delle CTRL (Fig. 16.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

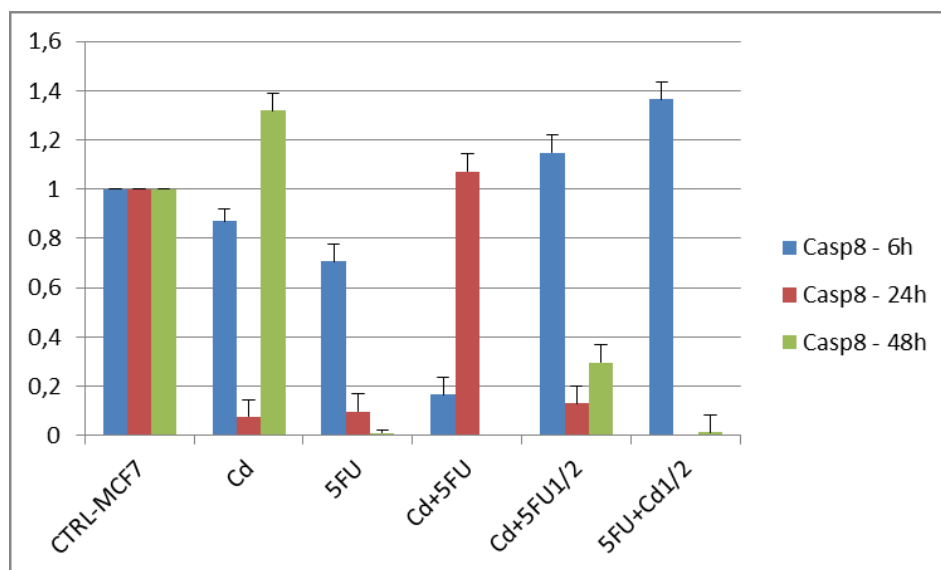


Fig. 17. Fold of increase di Caspase 8

L'espressione del gene Caspase 8 (gene pro apoptotico) è significativamente espressa rispetto ai CTRL nei punti Cd a 24h dove è di circa 0,3 volte maggiore e nel punto 5-FU + Cd ½ tempo a 6h dove è di circa 0,4 volte maggiore ai CTRL. L'espressione è di poco superiore ai CTRL nei punti Cd + 5-FU a 24h e Cd + 5-FU½ tempo a 6h. In tutti gli altri punti studiati, l'espressione è sotto espressa rispetto ai CTRL (Fig.17.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

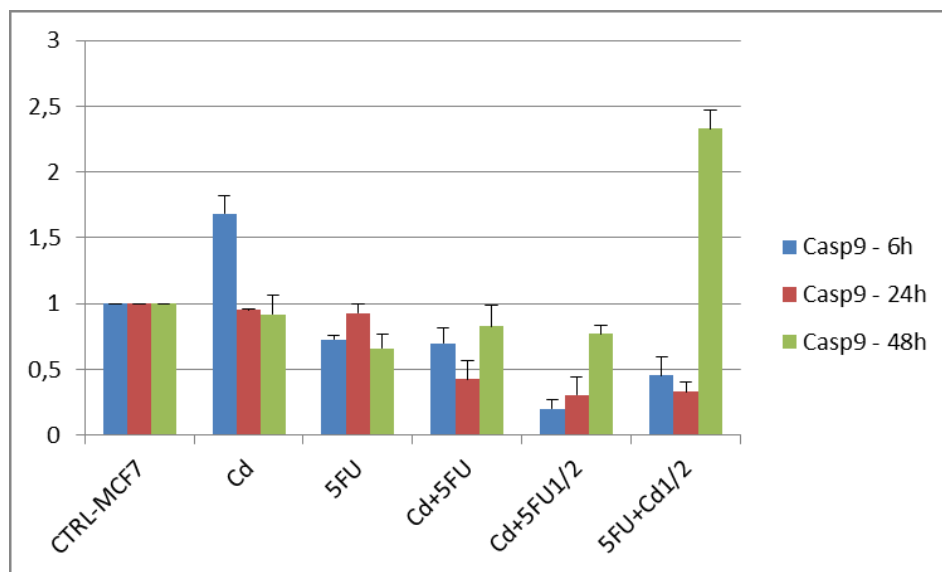


Fig. 18. Fold of increase di Caspase 9

L'espressione della Caspase 9 (gene pro apoptotico) è molto significativa nel punto 5-FU + Cd ½ tempo a 48h dove è di 1,5 volte maggiore rispetto ai CTRL, e nelle cellule trattate con Cd solo a 6h dove l'espressione è circa 0,7 volte maggiore di quella osservata nei CTRL. In tutti gli altri punti studiati l'espressione è sotto espressa rispetto ai CTRL (Fig. 18.).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

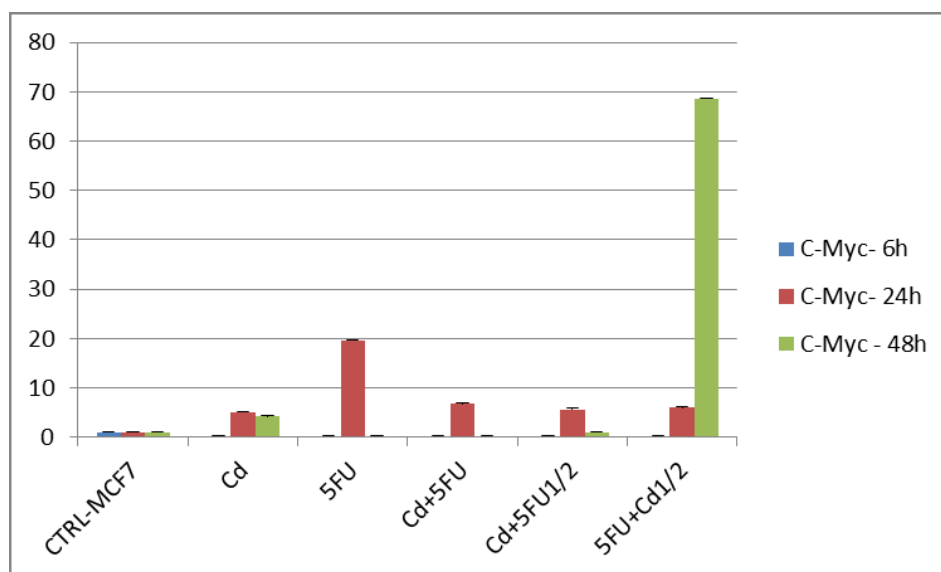


Fig. 19. Fold of increase di C-Myc

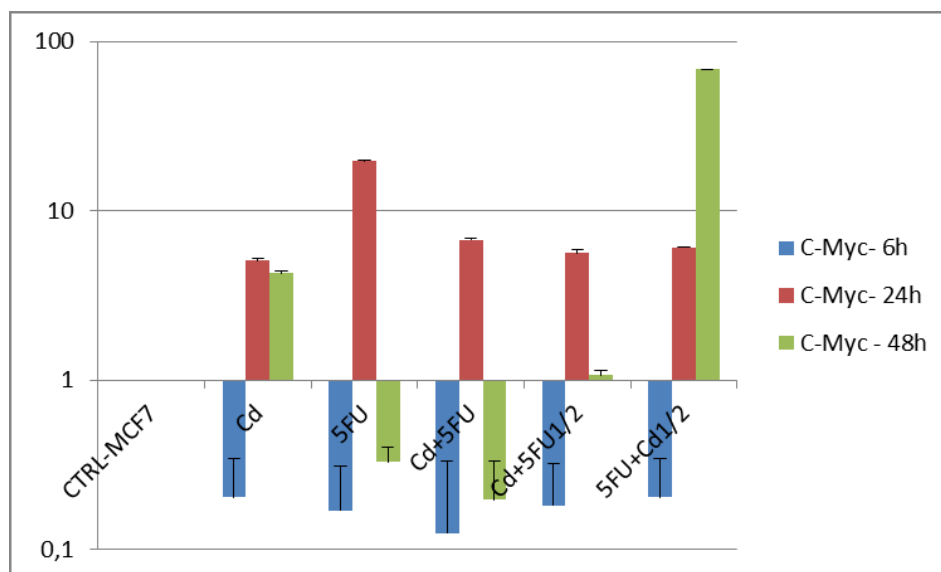


Fig. 19 bis. In scala logaritmica base 10. Fold of increase di C-Myc

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

L'espressione del gene C-Myc (gene protooncogene) risulta essere particolarmente significativa nel punto 5-FU + Cd $\frac{1}{2}$ tempo a 48h dove è di circa 70 volte superiore a quella di CTRL. Maggiormente espressa di circa 7 volte rispetto ai CTRL in tutti i punti studiati alle 24h, con un'espressione di 20 volte maggiore nelle cellule trattate con 5-FU solo a 24h (Fig.19, Fig.19 bis.).

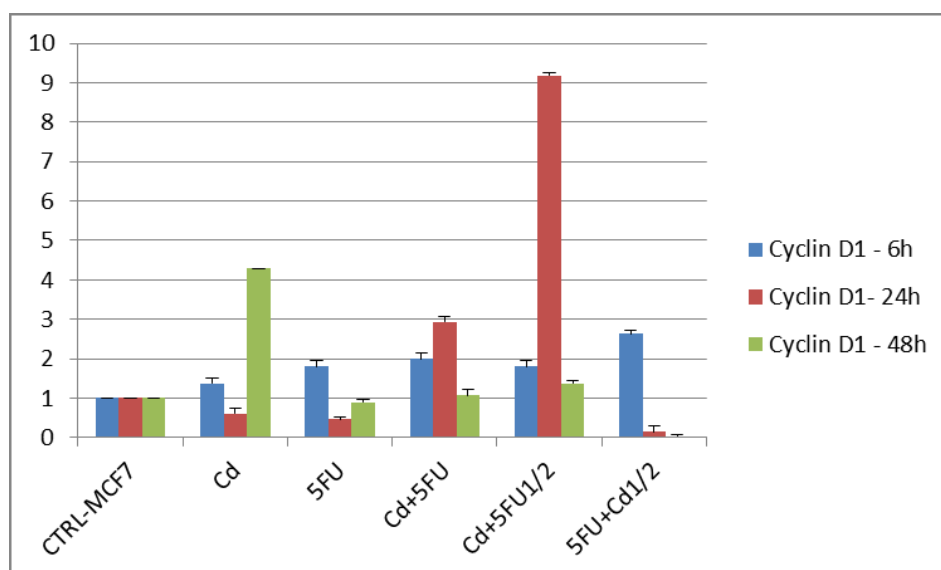


Fig. 20. Fold of increase di Cyclin D1

La Cyclin D1 (gene del checkpoint in G1/S phase of cellular cycle) è particolarmente espresso nel punto Cd + 5-FU ½ tempo a 24h dove è di circa 8 volte maggiore dei CTRL, circa il doppio a 6h e di poco maggiore a 48h. È espressa poco più di 3 volte i CTRL nel punto Cd a 48h, mentre nello stesso punto è sottoespressa a 24h e di circa 0,5 volte maggiore a 6h. Nelle cellule trattate con solo 5-FU si ha un'espressione della Cyclin D1 di quasi il doppio rispetto ai CTRL a 6h, e una sotto espressione a 24 e 48h. Nel punto Cd + 5-FU, l'espressione è due volte i CTRL a 6h e tre volte a 24h, simile a 48h. Nel punto 5-FU + Cd ½ tempo si ha un'espressione positiva e significativa solo a 6h dove è di 2,5 volte i CTRL (Fig.20).

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

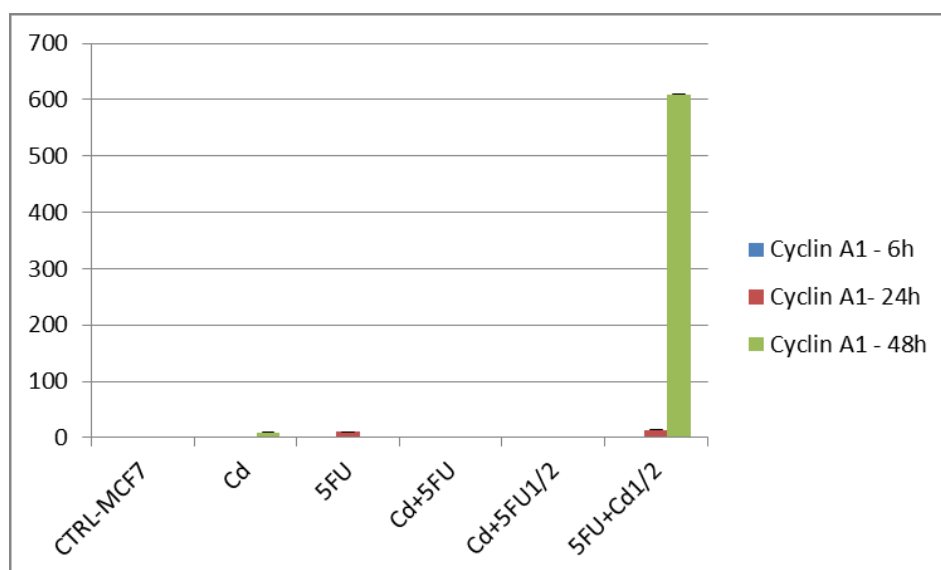


Fig. 21. Fold of increase di Cyclin A1

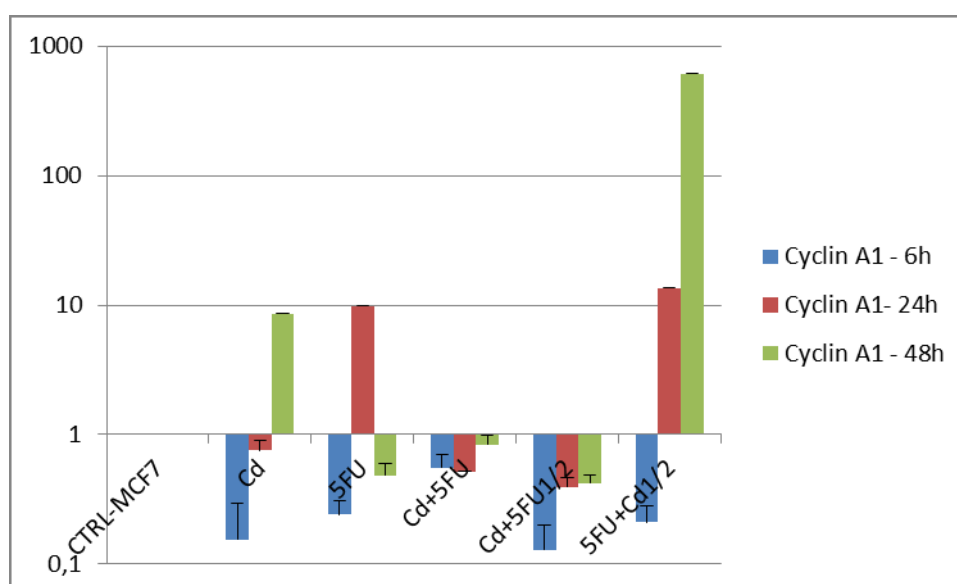


Fig. 21.bis. In scala logaritmica base 10. Fold of increase di Cyclin A1

La cyclin A1 (gene del checkpoint in G2/M phase of cellular cycle) è particolarmente significativa nel punto 5-FU + Cd ½ tempo alle 48h dove è 600 volte superiore ai CTRL, mentre alle 24h è espressa circa 20 volte più dei controlli. Il gene è espresso circa 8 volte più dei CTRL nelle cellule trattate con Cd solo alle 48h. Nelle cellule trattate con 5-FU solo l'espressione è di 10 volte maggiore alle 48h. In tutti gli altri punti sperimentali abbiamo osservato una sotto espressione genica della Cyclin A1 rispetto alle MCF-7 di controllo (Fig. 21., Fig. 21 bis.).

V.5 Espressione Proteica

La proteina Bcl-2 viene espressa in maniera crescente passando dalle 6h alle 48h di incubazione delle cellule trattate in particolare con Cd solo, con 5-FU e con 5-FU+Cd½ tempo. Tuttavia abbiamo osservato un incremento dell'espressione dei livelli di Bcl2 nelle cellule trattate con 5-FU+Cd½ tempo alle 48h. Al contrario le cellule trattate con Cd+ 5-FU utilizzati contemporaneamente, hanno mostrato una sotto espressione (down regulation) della proteina sia precocemente alle 6h che tardivamente alle 48h.

L'espressione della proteina P53 non si modifica significativamente nei vari punti sperimentali ai diversi punti tempo. Si è tuttavia osservato un aumento dell'espressione nelle cellule trattate con Cd solo e con la combinazione di Cd+5-FU, in particolare una maggiore espressione (up

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

regulation) nelle cellule trattate con Cd solo nel punto a 6h, maggiore espressione nelle cellule trattate con 5-FU solo a 24h.

La proteina Caspase-8 nelle cellule trattate con la combinazione di 5-FU + Cd ha mostrato un'espressione crescente rispetto alle cellule MCF-7 di controllo, nei differenti punti tempo analizzati. Inoltre abbiamo notato che nelle cellule trattate con Cd a 6h e con 5-FU + Cd ½ tempo alle 48h si è visto un miglioramento dell'espressione proteica della Caspase 8.

L'espressione della proteina C-Myc viene indotta nelle cellule trattate con Cd e Cd+5-FU dopo 24h di trattamento; dopo le 48h di trattamento si ha un forte incremento della proteina C-Myc nel punto 5-FU + Cd ½ tempo.

Abbiamo osservato un'espressione proteica ridotta quando il 5-FU viene utilizzato singolarmente rispetto a quando si effettua il trattamento delle cellule con 5-FU + Cd ½ tempo dopo 24h e 48h.

Per quanto riguarda le Cyclin A1, Cyclin D1, si conferma l'espressione antagonista vita nello studio dell'espressione genica.

La Cyclin A1 incrementa precocemente a 6h, dopo il trattamento con 5-FU. Nelle cellule indotte con 5-FU per 48h non si ha incremento di espressione. Si osserva una buona espressione di Cyclin A1 dopo 24h e dopo 48h nelle cellule trattate con 5-FU + Cd ½ tempo

Per quanto riguarda l'espressione della Cyclin D1, sia nelle cellule trattate con Cd solo, con 5-FU solo che nelle varie combinazioni

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

utilizzate, abbiamo osservato un'incrementata espressione proteica aumentando i tempi di trattamento secondo la tabella sperimentale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Autore: Yolande Asara
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7:
analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.
Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

V.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il Cd è un metallo pesante presente nell'ambiente con provati effetti carcinogenici su numerosi organi quali il polmone, il fegato, i reni, la prostata e altri organi (Waalkes MP. 2003). Gli effetti dannosi sul citoscheletro cellulare, possono portare sino a completa disgregazione dei microtubuli (Gerspacher C.) e distruzione della proteina Actina di tipo filamentoso (Asara Y. ; Liu Y.).

L'azione proliferativa del Cd sulla linea cellulare MCF-7 di carcinoma mammario è stata provata (Garcia-Morales P.). Inoltre, il 5-FU è un farmaco antitumorale, con un importante ruolo nei protocolli standard di chemioterapia, per un range di tumori solidi che include il tumore mammario e il tumore colon rettale (Cunningham D.).

Abbiamo osservato nelle cellule trattate con solo Cd cambiamenti ultra strutturali, inoltre presenza di vacuoli di natura secretiva nel citoplasma plasmatico, da noi definiti come probabili lisosomi.

Le cellule MCF-7 hanno capacità di produrre queste vescicole come risposta alle sollecitazioni al Cd. L'aumento delle vescicole lisosomiali dopo l'esposizione al Cd è un meccanismo di difesa cellulare già conosciuto per facilitare il sequestro e la secrezione di sostanze assimilate da parte della cellula dall'ambiente circostante (Asara Y.; Asar M.).

Inoltre il Cd induce un rigonfiamento dei mitocondri con presenza di matrice mitocondriale più densa rispetto a quella delle cellule MCF-7 di

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

controllo, le quali avevano mitocondri globulari con regolari creste lamellari. Nelle cellule di carcinoma mammario si può supporre un coinvolgimento dei mitocondri nei fenomeni di stress ossidativo (Zhang Y.), e le alterazioni morfologiche delle membrane da noi osservate potrebbero essere una possibile conseguenza delle modificazioni di trascrizione e trasduzione del gene della metallotioneina (Cannino G.). Inoltre nelle cellule trattate con Cd, i nuclei erano dislocati, a ridosso della membrana plasmatica, e una grande massa di vescicole e organuli cellulari erano collocati nella regione cellulare opposta.

I filamenti di Actina erano organizzati in grossi fasci a livello della membrana plasmatica, mentre i filamenti di Tubulina erano ben distribuiti in tutto il citoplasma diramandosi dalla membrana nucleare sino alla membrana plasmatica. Tutto ciò potrebbe dare una logica spiegazione alla posizione perimembranosa del nucleo cellulare (Asara Y.; Madeddu R. 2005).

È stato dimostrato che il Cd porta ad un aumento della proliferazione di cellule MCF-7 di tumore mammario ed è in grado di ostacolare la normale omeostasi cellulare innescando segnali che sarebbero diversamente spenti (Brama M.).

Infatti anche noi osserviamo che la Tubulina non andava incontro a cambiamenti strutturali e rimaneva ben distribuita sia nella regione nucleare che nella regione citoplasmatica, inoltre con solo Cd a basse concentrazioni (5 μ M) e per brevi periodi di tempo di incubazione (24 h)

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

si è osservata un'intensa attività metabolica e presenza di un maggior numero di mitocondri con un attivo tappeto cellulare proliferativo.

Nelle cellule trattate con 5-FU sono stati osservati evidenti segnali di degenerazione sia a livello citoplasmatico che a livello nucleare, le membrane non sono più integre e si evidenziano fenomeni di esocitosi.

Inoltre dopo il trattamento ad alte concentrazioni di 5-FU, le cellule sono apparse di forma maggiormente sferica e poco aderenti alla superficie della piastra di coltura. Questi effetti confermano le proprietà antitumorali dell'antimetabolita 5-FU, che agisce ostacolando la crescita cellulare e causando un incremento delle vescicole di secrezione di natura lisosomiale (Marchal JA. 2000).

Le cellule trattate con la combinazione di Cd e 5-FU non hanno mostrato alterazioni ultrastrutturali e presentavano caratteristiche cellulari simili a quelle delle MCF-7 trattate solo con Cd, indipendentemente dalla concentrazione di 5-FU usata. Abbiamo osservato che l'aspetto della Tubulina era paragonabile a quella delle cellule di controllo non trattate e che l'Actina aveva un'organizzazione non filamentosa simile a quella delle cellule trattate solo con Cd. Questi risultati suggeriscono che il Cd potrebbe bloccare l'azione antitumorale del 5-FU. Questo "blocco" previene la formazione di lisosomi citoplasmatici, che sarebbero in correlazione con lo stress ossidativo a livello mitocondriale (Cannino G.; Cuypers A.). Con la combinazione di Cd e 5FU erano osservabili poche vescicole lisosomiali.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Analizzando le correlazioni tra i risultati degli studi morfologici e gli aspetti biomolecolari coinvolti, siamo giunti alla stessa conclusione che il Cd aggiunto a cellule pretrattate con il farmaco chemioterapico 5-FU porterebbe ad un'inibizione degli effetti tossici del Cd sulla cellula tumorale.

I risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica, con qRT-PCR assay, sono concordanti con quelli dell'espressione proteica osservati con Immunoblot analysis.

L'aggiunta di Cd alle cellule già trattate con 5-FU induce un accrescimento dell'effetto anti-apoptotico del Bcl-2, inoltre delle proteine delle due Cyclin A1 e D1 e della C-Myc; abbiamo osservato una significativa correlazione inversa per la Cyclin A1 e D1, con una costante espressione della Cyclin D1 sia dal punto di vista genico che proteico nel punto precoce studiato alle 6h di trattamento delle cellule nelle varie condizioni sperimentali e una forte presenza della Cyclin A1 nel punto 5-FU+Cd ½ tempo alle 48h.

Tutto ciò ha la sua logica considerando che il gene Cyclin D1 regola il checkpoint in G1/S phase del ciclo cellulare, mentre il gene Cyclin A1 regola il checkpoint in G2/M phase del ciclo cellulare.

Notiamo, così come altri autori in un recente paper che hanno studiato la down regulation della Bcl2 su alcune linee cellulari (Singh R.), una down regulation del Bcl2 in presenza dei farmaci da noi utilizzati, di Cd a 24h e 5-FU sia a 6h che in tempi di esposizione più lunghi a 48h. Nelle cellule

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

trattate con la combinazione di Cd + 5-FU si ha invece un up regulation (di 10 volte), mentre in quelle con 5-FU + Cd ½ tempo di ben 80000 volte alle 24h e di 170000 alle 48h. Tutto ciò ci permette di fare una considerazione, il Bcl2 è un gene anti apoptotico e l'aggiunta di Cd a cellule trattate e pretrattate con 5-FU porterebbe ad un blocco dell'azione antitumorale del farmaco con conseguente proliferazione cellulare come già osservato da noi in microscopia.

I risultati dell'espressione del Bax sono concordanti con i dati rilevati per il Bcl2, infatti l'azione proapoptotica del Bax è poco presente nei punti Cd + 5-FU e 5-FU + Cd ½ tempo dove si ha invece una significativa up regulation per il gene Bcl2.

La Caspase 9 viene espressa poco più di una volta e mezzo nelle cellule trattate con solo cadmio rispetto alle cellule non trattate in tempi precoci di 6h, così come la Bcl2 (Singh R.), per poi ricomparire nei nostri studi solo nel punto in cui le cellule sono state preventivamente trattate con 5-FU e Cd aggiunto dopo ½ tempo dall'inizio dell'esperimento alle 48h. Stesso andamento viene analizzato nell'espressione della P53. La proteina p53 è espressa precocemente in presenza di Cd come visto da altri autori (Matsuoka M.), è espressa anche con solo 5-FU, per poi avere un'espressione molto meno marcata nelle cellule trattate con la combinazione Cd+5-FU. Il P53 è un onco suppressor e questo giustifica l'up regulation del 5-FU, ci spieghiamo il risultato di poca espressione in

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

combinazione con il fatto che il Cd abbia azione bloccante se somministrato contemporaneamente al 5-FU.

Invece la P53 è sovra espressa di 4 volte nel punto 5-FU e Cd aggiunto dopo $\frac{1}{2}$ tempo dall'inizio dell'esperimento (alle 48h).

I nostri risultati suggeriscono che il Cd possa avere una azione preventiva-bloccante nei confronti degli effetti citotossici del 5-FU sulle cellule di tumore mammario.

I nostri studi preliminari *in vitro* ci inducono a trovare ulteriori conferme dei risultati su un modello sperimentale di topo *in vivo*, ciò ci aprirebbe le porte ad un'applicazione dello studio su pazienti affette da carcinoma mammario, sotto terapia chemioterapica e su pazienti esposti a contaminazioni ambientali da Cd, includendo tra questi il fumo da sigarette attivo e passivo.

Ci aspettiamo di ottenere: riproducibilità *in vitro* delle condizioni analizzate nel vivente che si evincono da dati presi in letteratura, su studi di pazienti affette da carcinoma mammario esposte a terapie antitumorali e di soggetti esposti ad alcuni metalli da ricercare negli ambienti di vita quotidiana. In conclusione nella presente tesi abbiamo dimostrato l'importanza dell'interazione tra, il metallo pesante presente nell'ambiente circostante, il Cadmio, e la droga antitumorale il 5-FU. Sebbene molti meccanismi soprattutto di natura biomolecolari, siano ancora da indagare, i nostri studi suggeriscono che il Cd inibisce l'effetto citotossico del 5-FU sulle cellule di tumore mammario. Ci proponiamo di

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

effettuare ulteriori studi per meglio analizzare le correlazioni tra i nostri risultati morfologici e biomolecolari.

BIBLIOGRAFIA

Autore: Yolande Asara
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7:
analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.
Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

VI.BIBLIOGRAFIA

1. Antila E, Mussalo-Rauhamaa H, Kantola M, Atroshi F, Westermarck T. Association of cadmium with human breast cancer. *The Science of the Total Environment* 1996; 186: 251-256.
2. Asar M, Kayisli UA, Izgut-Uysal V.N, Akkoyunlu G. Immunohistochemical and ultrastructural changes in the renal cortex of cadmium-treated rats. *Biological Trace Element Research* 2004; vol. 97.
3. Asara Y, Marchal JA, Bandiera P, Mazzarello V, Delogu LG, Sotgiu MA, Montella A, Madeddu R. Cadmium influences the 5-Fluorouracil cytotoxic effects on breast cancer cells. *Eur J Histochem.* 2012; 56(1):e1.
4. Barbucci R, Sabatini A, Dapporto P. *Tavola periodica e proprietà degli elementi.* Firenze, Edizioni V. Morelli, 1998.
5. Benbrahim-Tallaa L, Tokar EJ, Diwan BE, Dill AL, Coppin JF, Waalkes MP. Cadmium malignantly transforms normal human breast epithelial cells into a basal-like phenotype. *Environ Health Perspect* 2009; 117(12): 1847-52.
6. Bell SW, Master SK, Ingram P, Waters M, Shelburne JD. Ultrastructure and x-ray microanalysis of macrophages exposed to cadmium chloride. *Scanning Microscopy* 1979; 111.
7. Bocca B, Madeddu R, Asara Y, Tolu P, Marchal JA, Forte G. Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. *J Trace Elem Med Biol.* 2011; 25(1): 19-26.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

8. Bonsignore A, Ottenga F. *Medicina del lavoro*. ECIG, 2002.
9. Borgese F. *Gli elementi della tavola periodica. Rinvenimento, proprietà, usi. Prontuario chimico, fisico, geologico*, Roma, CISU, 1993.
10. Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G et al. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 264(1-2): 102-8.
11. Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB. Cadmium – A metallorhormone? *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009;1; 238(3): 266-71.
12. Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi A.M: Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*. 2009; 9: 377-384.
13. Charafe-Jauffret, E; Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adelaide J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, Bertucci F. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 2006; 25 (15): 2273–2284.
14. Chiber R. and Ord M. Cadmium-induced multistep transformation of cultured Indian muntjac skin fibroblast. *Bio Metals* 1990; 3: 213-221.
15. Cunningham D and Coleman R. New options for outpatient chemotherapy the role of oral fluoropyrimidines. *Cancer Treat Rev* 2001; 27: 211-220.
16. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 2010; DOI

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

10.1007/s: 10534-010-9329-x.

17. De Pasquale J. Rearrangement of the F-Actin cytoskeleton in estradiol-treated MCF-7 breast carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* 1999; 112: 341-350.

18. Ehlers EM and Schubert C. Differences in morphology and cytoskeleton of MCF-7 and Mx-1 cells after therapy with OH-Tamoxifen and the pure estrogen antagonist ZM 182780. *Annals of Anatomy* 1999; 231-236.

19. Falcó G, Llobet JM, Bocio A, Domingo JL. Daily intake of arsenic, cadmium, mercury, and lead by consumption of edible marine species. *J Agric Food Chem* 2006; 9: 54(16): 6106-6112.

20. Forge A, Nevill G, Zajic G, Wright A. Scanning electron microscopy of the mammalian organ of corti: assessment of preparative procedures. *Scanning Microscopy* 1992; vol.6, No. 2: 521-535.

21. Forte G, Madeddu R, Tolu P, Asara Y, Marchal JA, Bocca B. Reference intervals for blood Cd and Pb in the general population of Sardinia (Italy). *Int J Hyg Environ Health* 2011; 214(2): 102-9

22. Galal-Gorchev H. Dietary intake, levels in food and estimated intake of lead, cadmium and mercury. *Food Add Contam* 1993; 10:115-128.

23. Garcia-Morales P, Saceda M, Kenney N, Kim N, Salomon DS, Gottardis MM et al. Effects of Cadmium on estrogen receptor of levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1994; 269 (24): 16896-16901.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

24. Geeth Gunawardana C, Martinez RE, Weiqun Xiao, Templeton DM. Cadmium inhibits both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 290: F1074-F1082.
25. Gerspacher C, Scheuber U, Schiera G, Proia P, Gyax D, Di Liegro I. The effect of cadmium on brain cells in culture. *International Journal of Molecular Medicine* 2009; 24: 311-318.
26. Glodek, Cass, Ph.D., "A History of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement," 1990, page 68, Michigan Cancer Foundation, Detroit.
27. Huynh T, Zhang H, Noller B. Evaluation and application of the diffusive gradients in thin films technique using a mixed-binding gel layer for measuring inorganic arsenic and metals in mining impacted water and soil. *Anal Chem.* 2012; 84(22): 9988-95.
28. Jian H, Coleman J, Miskimins R, Miskimins K. Expression of constitutively active 4EBP-I enhances p27^{kip1} expression and inhibits proliferation of MCF7 breast cancer cells. *Cancer Cell International* 2003; 3:2.
29. Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, and Kunkel TA et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 2003; 34(3): 326-9.
30. Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G et al. Cadmium mimics the *in vivo* effects of estrogen in the uterus and mammary gland. *Nature Medicine* 2003; 9(8): 1081-4.

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

31. Kovala-Demertzi D, Staninska M, Garcia-Santos I, Castineiras A, Demertzis MA. Synthesis, crystal structures and spectroscopy of meclofenamic acid and its metal complexes with manganese (II), copper (II), zinc (II) and cadmium (II). Antiproliferative and superoxide dismutase activity. *J Inorg Biochem* 2011; 105(9): 1187-95.
32. Lacroix M; Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update". *Breast Research and Treatment* 2004; 83 (3): 249–289.
33. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13 (2): 293–325.
34. Levenson, AS; Jordan VC. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research* 1997; 57 (15): 3071–3078.
35. Lewis GP, Coughlin L, Jusko W, Hartz S. Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. *Lancet* 1972; 1: 291-292.
36. Lin YS, Caffrey JL, Lin JW, Bayliss D, Faramawi MF, Bateson TF, Sonawane B. Increased risk of cancer mortality associated with cadmium exposures in older americans with low zinc intake. *J Toxicol Environ Health A*. 2013; 76(1): 1-15.
37. Liu Y and Templeton DM. Role of the cytoskeleton in Cd²⁺-induced death of mouse mesangial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2010; 88(3): 341-52.
38. Lukyanova NYu, Rusetskya NV, Tregubova NA, Chekhun VF. Molecular and cell cycle in MCF-7 cells resistant to cisplatin and

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

doxorubicin. *Exp Oncol* 2009; 31(2): 87-91.

39. Madeddu R, Aranega A, Arena N, Malaguenera L, Marchal JA, Prados JC et al. Indirect immunofluorescence study on the cytoskeleton of normal (FG) and neoplastic (SGS/3A) cadmium treated fibroblasts. *Ital J Anat Embryol* 2005; 110(4): 225-36.

40. Madeddu R, Muresu E, Montella A, Chessa G, Cherchi GB, Piras P et al. Low Cadmium concentration in whole blood from residents in Northern Sardinia (Italy) with special reference to smoking habits. *JPMH* 2009; 50 (1): 46-52.

41. Madeddu R, Solinas G, Forte G, Bocca B, Asara Y, Tolu P, Delogu LG, Muresu E, Montella A, Castiglia P. Diet and nutrients are contributing factors that influence blood cadmium levels. *Nutr Res.* 2011; 31(9): 691-7.

42. Madeddu R , Tolu P , Asara Y, Farace C, Forte G, Bocca B. Blood biomonitoring of metals in subjects living near abandoned mining and active industrial areas. *Environmental Monitoring Assessment* 2012; DOI 10.1007/s10661-012-2988-z.

43. Marchal JA, Melguizo C, Prados J,, Aránega AE, Gómez JA, Campos J et al. Modulation of Myogenic Differentiation in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line by a New Derivative of 5-Fluorouracil (QF-3602). *Jpn. J. Cancer Res* 2000; 91: 934–940.

44. Marchal JA, Boulaiz H, Suarez I, Saniger I, Campos J, Carillo E et al. Growth inhibition, G₁-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives. *Investigational New Drugs* 2004; 22: 379-389.

45. Marchal JA, Rodríguez-Serrano F, Caba O, Aránega A, Gallo MA, Espinosa A et al. Antiproliferative activity, cell-cycle dysregulation, and cellular differentiation: salicyl- and catechol-derived acyclic 5-fluorouracil O,N-acetals against breast cancer cells. *ChemMedChem* 2007; 2(12): 1814-21.

46. Martin MB, Reiter R, Pharm T, Avellanet YR, Camara J, Lahm M et al. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2003; 144 (6): 2425-2436.

47. Matović V, Buha A, Bulat Z, Dukić-Ćosić D. Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2011; 62(1): 65-76. Review.

48. Matsuoka M. and Igisu H. Cadmium Induces Phosphorylation of p53 at Serine 15 in MCF-7 Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(5): 6.

49. Moy G, Käferstein F, Kim YM, Motarjemi Y, Quevedo F. Dietary exposure to lead, cadmium, mercury and polychlorinated biphenyls. *Arch Lebensmittelhyg* 1993; 44: 45-51.

50. Nadkarni RA: Some considerations of metal content of tobacco products. *Chem Ind* 1974; 17: 693-696.

51. Oskarsson A, Widell A, Olsson IM, Grawé KP. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. *Biometals* 2004;

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

17 (5): 531-534.

52. Russell D, Soulimane T. Evidence for zinc and cadmium binding in a CDF transporter lacking the cytoplasmic domain. *FEBS Lett.* 2012 Nov 2

53. Shimoda R, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP. Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol Sci* 2001; 64(2): 208-15.

54. Singh R, Saini N. Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis - a combined computational and experimental approach. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 6): 1568-78.

55. Sirot V, Guérin T, Volatier JH, Leblanc JC. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Sci Total Environ* 2009; 407; 6: 1875-85.

56. Soule, HD; Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1973; 51 (5): 1409–1416.

57. Suresh Vir Singh Rana. Metals and apoptosis: Recent developments. Review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2008; 22: 262-284.

58. Tremlová J, Száková J, Sysalová J, Tlustoš P. Bioavailability of arsenic, cadmium, iron and zinc in leafy vegetables amended with urban particulate matter suspension. *J Sci Food Agric.* 2012 Sep 6.

59. Villalobos M., Olea N., Brotons J.A., Olea-Serrano M.F., Ruiz de

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

Almodóvar J.M., Pedraza V. The E-Screen assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks. *Env. Health Perspect.* 1995; vol 103(9): 844-849.

60. Zhang Y, Li JH, Jiang FL, Tian FF, LiuY. Spectroscopic and microscopic studies on the mechanisms of mitochondrial toxicity induced by different concentrations of cadmium. *J Membr Biol* 2011; 241(1): 39-49.

61. Waalkes MP, Rehm S, Riggs CW, Bare RM, Devor DE, Poirier LA et al. Cadmium carcinogenesis in male Wistar rats: dose-response analysis of tumor induction in the prostate and testes and at the injection site. *Cancer Res* 1988; 48: 4656–4663.

62. Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533(1-2): 107-20. Review.

SITOGRAFIA

Autore: Yolande Asara
Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7:
analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.
Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari

VII.SITOGRAFIA

63. <http://www.cancer.gov>.

64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>

65. <http://www.wikipedia.com>

Autore: Yolande Asara

Titolo della tesi: Effetti del Cadmio e del 5 Fluorouracile su cellule di tumore mammario MCF7: analisi morfostrutturale, di espressione genica e proteica.

Tesi di Dottorato in: Fisiologia, morfologia, farmacologia e fisiopatologia del sistema nervoso
Università degli Studi di Sassari