

ONCOLOGIA CANINA

I glicosaminoglicani nei tumori cerebrali di cane: studio preliminare

Stefano Amedeo*, Maria Teresa Capucchio*, Alberto Valazza*, Deborah Catalano*, Federica Sammartano*
Fulvia Cerruti**, Silvia Mioletti**

*Centro di Referenza Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Patologia Animale, Università degli Studi di Torino

**Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria Università degli Studi di Torino

RIASSUNTO

Lo scopo di questa ricerca è stato l'analisi dei glicosaminoglicani (GAGs) in alcuni tumori cerebrali di cane, localizzati a livello di parenchima encefalico e meningi, in confronto a tessuto sano di controllo. Gli autori hanno riscontrato differenze riguardanti queste molecole tra il tessuto neoplastico e il tessuto corrispondente prelevato in soggetti sani sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, anche se occorrerà ampliare la casistica per confermare questi dati preliminari.

Parole chiave: glicosaminoglicani, tumori cerebrali, biochimica, cane.

SUMMARY**Glycosaminoglycans in canine cerebral tumors: a preliminary study**

The aim of this study was the biochemical analysis of glycosaminoglycans in some dog tumours involving the brain and the meninges, as well as in normal nervous system tissues as control. The authors demonstrated qualitative and quantitative differences about GAGs composition between pathologic and normal tissues, even if it is necessary to increase the number of cases to confirm these preliminary data.

Key words: glycosaminoglycans, cerebral tumours, biochemistry, dog.

I glicosaminoglicani (un tempo chiamati *mucopolisaccaridi*) sono costituiti da catene disaccaridiche ripetitive contenenti un derivato di un amminozucchero (glucosamina o galattosamina). Tra i più importanti si ricordano l'acido ialuronico (HA), il condroitin solfato (CS), il dermatan solfato (DS), l'eparansolfato (HS), l'eparina e il cheratano solfato (KS). Essi sono componenti fondamentali della matrice extracellulare e della superficie delle cellule animali e, ad eccezione dell'acido ialuronico, possono presentarsi covalentemente legati a un "core" proteico per formare *proteoglicani*. Queste molecole sono coinvolte in un'ampia serie di funzioni biologiche, come ad esempio la risposta immunitaria oppure la differenziazione, la proliferazione e la migrazione cellulare [15,16,23,25]; si ritiene inoltre che esse rivestano un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella maturazione del sistema nervoso centrale, agendo come regolatori nel riconoscimento cellulare, nella sinaptogenesi e nella plasticità strutturale [1, 19, 24]. Molti autori hanno dimostrato un coinvolgimento dei GAGs nella genesi di parecchi processi patologici, tra i quali la crescita tumorale [11, 12, 13, 14, 21, 24, 26], e in particolare alcune ricerche hanno messo in luce variazioni istologiche e biochimiche nella composizione dei glicosaminoglicani in diversi tipi di neoplasie cerebrali nell'uomo [2, 4, 9, 10, 20]. Poiché però i dati disponibili in letteratura riguardanti tali molecole nei tumori cerebrali di altre specie sono estremamente limitati, in questo studio preliminare si è ritenuto interessante studiare i glicosaminoglicani da un punto di vista biochimico in alcune neoplasie cerebrali di cane, con-

frontando il quadro ottenuto nel tessuto patologico con tessuto corrispondente sano di controllo.

Materiali e metodi

Per questo lavoro sono state prese in esame sei neoplasie cerebrali, localizzate a livello di parenchima encefalico e meningi, di cani adulti soppressi in seguito a gravi deficit neurologici, e sei campioni di tessuto encefalico (sostanza bianca e grigia) prelevato in aree analoghe a quelle affette da tumore da cani adulti, deceduti per patologie non neurologiche, da utilizzare come controllo sano. Ciascun campione è stato suddiviso in due parti, una per l'esame istologico e l'altra per l'analisi biochimica. I sei tumori cerebrali sono stati classificati istologicamente [17] come: due meningiomi transizionali, due meningiomi meningotelomatosi, un astrocitoma gemistocitico e un carcinoma dei seni frontali. Per l'analisi istologica i tessuti normali e patologici sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni di 4 µm e colorati con ematossilina-eosina. Per i saggi biochimici i campioni sono stati omogeneizzati, digeriti con papaina e deproteineizzati con acido tricloroacetico. I glicosaminoglicani sono poi stati ottenuti per precipitazione mediante aggiunta di etanolo, seguita da liofilizzazione e solubilizzazione in acqua distillata [8]. L'analisi quantitativa dei GAGs è stata ottenuta con il metodo di Bitter e Muir [5], utilizzando glucuronolattone come standard, ed espressa come µg di acido uronico per g di tessuto secco. I GAGs sono poi stati analizzati qualitativamente

tramite elettroforesi su lastre di acetato di cellulosa secondo il metodo di Cappelletti et al. [6,7] e colorate con Alcian blue 8GX, utilizzando come standard condroitin-6-solfato (CC), condroitin-4-solfato (CA), acido ialuronico (HA), eparan solfato (HS); l'elettroforesi lo separa in HS_I e HS_{II}, e dermatan solfato (DS), (Sigma, St. Louis, MO, USA), (foto 1). Le bande elettroforetiche sono state analizzate con un densitometro (Apraise Junior Densitometer, Beckman Instruments), (figura 1) e le concentrazioni relative delle singole frazioni dei glicosaminoglicani sono state espresse in percentuale.

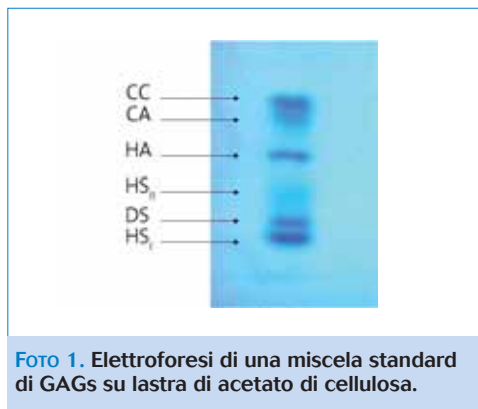
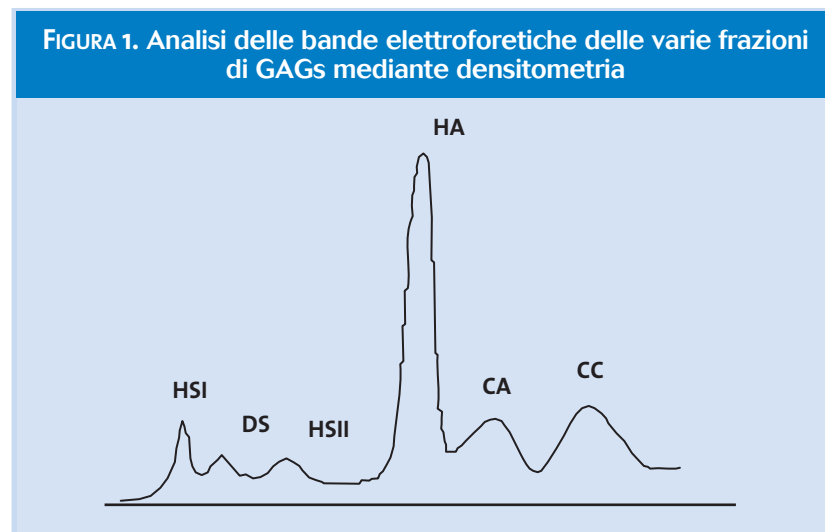


Foto 1. Elettroforesi di una miscela standard di GAGs su lastra di acetato di cellulosa.

Risultati

I risultati delle analisi quantitative e qualitative dei GAGs sui campioni cerebrali di cane sono riassunti nella tabella 1. Il contenuto totale di glicosaminoglicani è apparso più alto nella sostanza grigia rispetto a quella bianca; la concentrazione di GAGs nei meningiomi meningoteliosarcomatosi e nell'astrocitoma è risultata abbastanza simile a quella osservata nel tessuto normale, in contrapposizione a valori più elevati quantificati nei meningiomi transizionali e nel carcinoma del seno frontale. Dal punto di vista qualitativo, rispetto alla sostanza bianca e grigia di controllo, nei meningiomi meningoteliosarcomatosi, nell'astrocitoma gemistocitico e nel carcinoma dei seni frontali si è osservata una maggiore percentuale di CA mentre l'HA sembra diminuire. I meningiomi transizionali e meningoteliosarcomatosi e il carcinoma dei seni frontali



paiono possedere più elevati valori di DS e HS_I; inoltre i meningiomi transizionali e l'astrocitoma mostrano un contenuto percentuale più elevato di HS_{II} rispetto al tessuto sano.

TABELLA 1. Determinazione quantitativa e qualitativa dei GAGs nel sistema nervoso centrale di cane in tessuti normali e patologici

	N° di casi	µg ac. uronici/g tessuto secco	CC%	CA %	HA %	HS _{II} %	DS %	HS _I %
Sostanza bianca	3	1,20 (1,1-1,3)	0	27,2 (26,4-28,3)	52,5 (45-62,7)	5,7 (4,4-7,8)	2,2 (1,63)	0
Sostanza grigia	3	1,55 (1,3-1,8)	0	33 (37,7-32,2)	40,4 (37,6-42,7)	13,4 (10,6-17,6)	4,5 (4,2-5,5)	0
Meningiomi transizionali	2	3,70 (3,4-4,0)	0	29,7 (27,5-32)	31,5 (28-35)	19,6 (11,7-27,5)	9,3 (5,3-13,3)	7,4 (6,5-8,4)
Meningiomi meningoteliosarcomatosi	2	1,25 (1,0-1,5)	0	36,8 (32-41,6)	16,6 (14,8-18,4)	<1	38 (37-39)	14,1 (8,5-19,8)
Astrocitoma gemistocitico	1	0,9	0	36,5	32,98	28,1	2	<1
Carcinoma del seno frontale	1	3,8	0	41,4	34,1	12,6	9,1	2,8

Considerazioni e conclusioni

I glicosaminoglicani sono macromolecole biologiche presenti in tutti i tessuti e fluidi corporei e la loro concentrazione normalmente dipende dal tessuto in cui si trovano; variazioni del loro contenuto sono state osservate in diverse condizioni fisiologiche, ma soprattutto i cambiamenti più marcati vengono associati a condizioni patologiche e in particolare alle neoplasie. In questo lavoro abbiamo voluto approfondire questo argomento nei tumori cerebrali di cane poiché a tale riguardo in letteratura sono disponibili pochissimi dati. Le analisi qualitative e quantitative da noi effettuate hanno mostrato una più elevata concentrazione di glicosaminoglicani nella sostanza grigia rispetto a quella bianca, in accordo con dati riportati in precedenza dalla letteratura nel bovino [18] e nell'uomo [2]. La più elevata concentrazione di queste molecole osservata nei meningiomi transizionali e nel carcinoma dei seni frontali rispetto al tessuto normale concorda con quanto osservato nell'uomo [2] e può essere messa in relazione alla ricca vascolarizzazione, alla localizzazione e alle caratteristiche intrinseche delle cellule neoplastiche. Il quadro elettroretico mostra una più elevata percentuale di

CA nei meningiomi meningoteliosarcomi, nell'astrocitoma gemistocitico e nel carcinoma del seno frontale, una minore percentuale di HA in tutti i tumori considerati e un aumento dell' HS_{II} nei meningiomi transizionali e nell'astrocitoma gemistocitico rispetto ai tessuti di controllo in accordo con quanto osservato nel cervello umano [2,4]. I nostri risultati indicano una maggiore percentuale di DS sia nella sostanza grigia che in quella bianca rispetto a quella descritta nell'uomo, ma in letteratura ci sono tuttora dati discordanti in proposito. Dalla nostra ricerca inoltre emerge una maggiore percentuale di DS nei meningiomi e nel carcinoma del seno frontale rispetto ai valori riportati nell'uomo, mentre un aumento della percentuale di HS_I nei meningiomi del cane concorda con quanto riportato per i tumori cerebrali in umana [2]. In conclusione, anche se questi dati preliminari necessitano di ulteriori approfondimenti mediante l'analisi di un maggior numero di casi, possiamo affermare sulla base delle nostre osservazioni, che la distribuzione biochimica dei GAGs è caratteristica per ciascun tipo di tumore, in relazione al tessuto di origine della neoplasia e alle differenti modalità di accrescimento tumorale, come già riportato precedentemente nell'uomo. ■

Bibliografia

- 1-Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 2000; vol. 80, n. 4: pp. 1267-90.
- 2-Bertolotto A, Giordana MT, Magrassi ML, Mauro A, Schiffer D. Glycosaminoglycans (GAGs) in human cerebral tumour. *Acta Neuropathol.* 1982; vol. 58: pp. 115-119.
- 3-Bertolotto A, Magrassi ML. Cellulose acetate electrophoresis of glycosaminoglycans in the central nervous system. *Electrophoresis* 1984; vol. 5: pp. 97-101.
- 4-Bertolotto A, Giordana MT, Orsi L, Orsi R, Schiffer D. Biochemical, histochemical and immunohistochemical study of glycosaminoglycans in human meningiomas. *Bas. Appl. Histochem.* 1989; vol. 33: pp. 239-249.
- 5-Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Analyt. Biochem.* 1962; vol. 4: pp. 330-334.
- 6-Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP. Rapid multisample separation of the five most widespread animal glycosaminoglycans. *Analyt. Biochem.* 1979a; vol. 93: pp. 37-40.
- 7-Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP. A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run. *Analyt. Biochem.* 1979b; vol. 99: pp. 311-315.
- 8-Cappelletti R., Del Rosso M., Chiarugi VP. A new method for characterization on N-sulphate glycosaminoglycans by a rapid and multisample nitrous acid treatment during an electrophoretic run and its application to the analysis of biological samples. *Analyt. Biochem.* 1980; vol. 105: pp. 430-435.
- 9-Delpech B, Maingonnat C, Girard N, Chauzy C, Maunoury R., Olivier A, Tayot J, Creissard P. Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur. J. Cancer.* 1993; vol. 29A, n. 7: pp. 1012-7.
- 10-Giordana MT, Bertolotto A., Mauro A, Migheli A, Pezzotta S, Racagni G, Schiffer D. Glycosaminoglycans in human cerebral tumour. *Acta Neuropathol.* 1982; vol. 57: pp. 299-305.
- 11-Hinrichs U, Rutteman GR., Nederbraght H. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. *Br. J. Cancer.* 1999; vol. 80, n. 9: pp. 1359-65.
- 12-Iida J, Meijne A.M, Kutson JR, Furcht LT, McCarthy JB. Cell surface chondroitin sulfate proteoglycans in tumour cell adhesion, motility and invasion. *Cancer Biol.* 1996; vol. 7, n. 3: pp. 155-62.
- 13-Iozzo RV. Proteoglycans: structure, function, and role in neoplasia. *Laboratory Investigation.* 1985; 53: vol. 373-396.
- 14-Iozzo RV. Proteoglycans and neoplasia. *Cancer Metastasis Rev.* 1988; vol. 7, n. 1: pp. 39-50.
- 15-Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; vol. 67: pp. 609-52.
- 16-Iozzo RV. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; vol. 6, n. 8: pp. 646-56.
- 17-Koestner A, Bilzer T, Fatzner R, Schulman FY, Summers BA, Van Winkle TJ. Histological classifications of tumors of the nervous system of domestic animals. WHO Armed Force Institute of Pathology Washington D.C.; 1999.
- 18-Margolis RU. Acid mucopolysaccharides and proteins of bovine whole brain, white matter and myelin. *Biochem. Biophys. Acta.* 1967; vol. 141: pp. 91-102.
- 19-Margolis RK, Margolis R.U. Nervous tissue proteoglycans. *Experientia.* 1993; vol. 49, n. 5: pp. 429-46.
- 20-Mauro A, Bertolotto A, Giordana MT., Magrassi ML, Migheli A and Schiffer D. Biochemical and histochemical evaluation of glycosaminoglycans in brain tumour induced in rats by nitrosourea derivatives. *J. Neurooncol.* 1983; vol. 1, n. 4: pp. 299-306.
- 21-Mitropoulou TN, Theocharis AD, Stagiannis KD, Karamanos NK. Identification, quantification and fine structural characterization of glycosaminoglycans from uterine leiomyoma and normal myometrium. *Biochimie.* 2001; vol. 83: pp. 529-536.
- 22-Mitropoulou TN and Stagiannis KD. Variation in sulfation pattern of galactosaminoglycan development of uterine leiomyoma. *Bio-med. Chromatogr.* 2004; vol. 18: pp. 411-413.
- 23-Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem. J.* 1986; vol. 236: pp. 1-14.
- 24-Rauch U. Extracellular matrix components associated with remodelling process in brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004; vol. 61: pp. 2031-2045.
- 25-Schwartz N. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Front. Biosci.* 2000 Jul 1; vol. 5: pp. D649-55.
- 26-Theocharis AD, Vynios DH., Papageorgakopoulou N, Skandalis SS, Theocharis DA. Altered content composition and structure of glycosaminoglycans and proteoglycans in gastric carcinoma. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; vol. 35: pp. 376-390.