



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**Valutazione degli effetti di chemioterapici convenzionali
e di nuova generazione sul profilo metabolico di cellule
di Glioblastoma U251: analisi mediante
Immunofluorescenza e Western Blot**

Relatore:

Dott.ssa Ludovica Gaiaschi

Correlatore:

Prof.ssa Maria Grazia Bottone

Tesi Sperimentale di
Francesco Scaccianoce

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE

- 1.1 Caratteristiche generali e classificazione del Glioblastoma.....p.1
- 1.2 Trattamento e approcci terapeutici convenzionali e innovativi.....p.7
- 1.3 Il metabolismo energetico tumorale e l'Effetto Warburg: ruolo delle principali vie di segnalazione alterate nel GB.....p.15
- 1.4 L'asse Ipossia/Pseudo-Ipossia e la Regolazione dei Trasportatori del Glucosio (GLUT1 e GLUT3).....p.21
- 1.5 Target terapeutici e strategie di inibizione dei GLUT nel Glioblastoma.....p.24

2. SCOPO DEL LAVORO.....p.28

3. MATERIALI E METODI

- 3.1 Colture cellulari e trattamenti farmacologici.....p.30
- 3.2 Analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot.....p.30
- 3.3 Analisi in Immunofluorescenza indiretta e Microscopia.....p.31
- 3.4 Analisi statistica.....p.31

4. RISULTATI

- 4.1 Valutazione dell'espressione e della localizzazione dei trasportatori facilitati del Glucosio: GLUT1 e GLUT3.....p.32
- 4.2 Caratterizzazione del bilancio bioenergetico mitocondriale e della risposta allo stress epigenetico: ATP5A e HIF-1 αp.37

5. DISCUSSIONE.....p.42

6. CONCLUSIONE.....p.47

7. BIBLIOGRAFIA.....p.50

1. INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche generali e classificazione del Glioblastoma

Il Glioblastoma (GB) rappresenta la neoplasia primaria del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata dal più alto grado di malignità e aggressività biologica. Dal punto di vista epidemiologico, questa patologia da sola è responsabile di oltre la metà dei casi di gliomi maligni (MG), i quali, a loro volta, costituiscono circa l'80% dei tumori cerebrali primari diagnosticati annualmente (1)

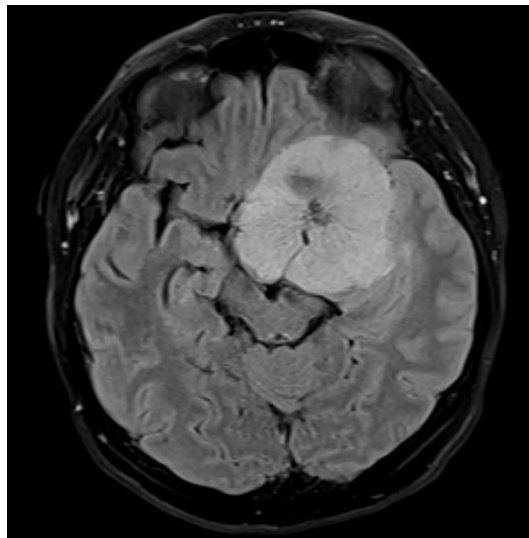


Figura 1: Risonanza magnetica cerebrale (RMN, sezione assiale) che mostra l'evidente effetto massa e la natura infiltrante tipica della lesione da glioblastoma. Fonte: Paul Biris

Il GB presenta un'incidenza superiore nelle popolazioni caucasiche rispetto a quelle non caucasiche, mostra una prevalenza 1,5 volte maggiore nel sesso maschile rispetto a quello femminile e l'età media alla diagnosi si attesta intorno ai 64 anni (Ostrom et al., 2018). Sotto il profilo clinico, la sintomatologia d'esordio comprende manifestazioni aspecifiche, quali cefalea, nausea, vertigini, stato confusionale, disturbi del linguaggio e repentine alterazioni della personalità (Ostrom et al., 2018). L'insorgenza e l'intensità di tali sintomi variano in stretta funzione dell'estensione volumetrica, della complessità morfologica della massa tumorale, dell'effetto massa esercitato dall'edema peritumorale e della sua specifica localizzazione neuroanatomica (Ostrom et al., 2018). Nei pazienti affetti da glioblastoma IDH-wildtype, l'espressione di questa complessa fisiopatologia determina l'insorgenza di deficit neurologici focali strettamente collegati ai diversi lobi cerebrali:

- **Lobi frontali:** le lesioni confinate a questo livello inducono tipicamente deficit cognitivi progressivi, emiparesi controlaterale e profonde alterazioni della sfera psiche-comportamentale.

- **Lobi temporali:** il loro coinvolgimento si associa frequentemente a crisi epilettiche parziali o generalizzate, deficit mnesici e afasia recettiva o sensoriale.
- **Lobi parietali e occipitali:** le masse localizzate a livello parietale si manifestano con disturbi sensitivi corticali, aprassia e disfunzioni visuospaziali, mentre l'interessamento del lobo occipitale determina emianopsia o quadranteanopsia.

A questa sintomatologia localizzata si sovrappongono segni clinici sistemici che riflettono l'instaurarsi di una severa sindrome da ipertensione endocranica, tra cui cefalea gravativa, tipicamente accentuata in clinostatismo, nausea, vomito a getto e un progressivo deterioramento dello stato di coscienza.

Il percorso diagnostico si articola, generalmente, attraverso un esame neurologico approfondito accoppiato a indagini di *imaging* neuroradiobiologico, in cui la Tomografia Computerizzata (TC) e la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) encefalo risultano indispensabili per valutare la sede, i confini e la complessità della massa neoplastica. Il *gold standard* per l'inquadramento diagnostico e per la stadiazione pre-operatoria è rappresentato dall'espressione della RMN con mezzo di contrasto al gadolinio, la quale è in grado di evidenziare la classica morfologia ad "anello" (*ring enhancement*) circoscrivente un *core* necrotico centrale. Tuttavia, la conferma diagnostica definitiva e la determinazione del grado di aggressività biologica necessitano dell'analisi istopatologica e molecolare del tessuto tumorale prelevato tramite biopsia o resezione chirurgica.

Storicamente, l'identificazione di questa variante neoplastica risale al 1926, quando i neuropatologi Percival Bailey e Harvey Cushing descrissero un glioma altamente aggressivo e contraddistinto da una marcata eterogeneità istologica, coniato il termine *Spongioblastoma Multiforme*. Tale nomenclatura derivava dal pleomorfismo accentuato delle cellule osservate, le quali non erano riconducibili né alla glia sana né ad altre tipologie di glioma allora note. Successivamente, il termine venne modificato in *Glioblastoma* per evidenziarne in modo diretto la derivazione dal lignaggio gliale. Le cellule gliali (comprendenti: astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali) costituiscono una popolazione cellulare eterogenea il cui ruolo fisiologico fondamentale consiste nel supportare, nutrire e regolare l'omeostasi e lo sviluppo della rete neuronale (Roda & Bottone, 2022).

L'evoluzione dei criteri classificativi operata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS/WHO) ha progressivamente integrato i parametri puramente morfologici con i profili molecolari e genetici.

L'attuale classificazione OMS 2021 suddivide i gliomi maligni in diverse macrocategorie (gliomi adulti diffusamente infiltranti, pediatrici, circoscritti e tumori glioneuronali), riconoscendo per i gliomi diffusi dell'adulto tre entità principali:

1. **Astrocitoma, IDH-mutante (gradi 2, 3 e 4):** neoplasie diffuse caratterizzate da mutazioni nei geni *IDH1* o *IDH2*. L'assegnazione del grado 4 può prescindere dalle classiche caratteristiche morfologiche qualora sia rilevabile la delezione omozigote del locus *CDKN2A/B*.
2. **Oligodendroglioma, IDH-mutante e 1p/19q-codeleto (gradi 2 e 3):** tumori diffusi che presentano la mutazione di *IDH1/2* associata alla co-delezione dei bracci cromosomici 1p e 19q, configurando generalmente una prognosi più favorevole e una migliore chemio-sensibilità.
3. **Glioblastoma, IDH-wildtype (grado 4):** Rappresenta la forma più aggressiva e a prognosi infausta. Secondo le linee guida OMS 2021, la diagnosi di glioblastoma di grado 4 viene formulata anche in assenza delle classiche alterazioni istologiche di alto grado (necrosi e proliferazione microvascolare), purché il tumore presenti specifiche alterazioni molecolari critiche: mutazione del promotore di *TERT*, amplificazione del gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) o guadagno/perdita combinata dei cromosomi +7/-10 (Louis et al., 2021).

La progressione dei gradi istologici (da 1 a 4) riflette fedelmente l'aumento dell'aggressività biologica del tumore: i gradi 1 e 2 definiscono lesioni a bassa malignità e a crescita lenta, sebbene il grado 2 mantenga un potenziale infiltrativo; il grado 3 denota tumori maligni a elevata attività mitotica; il grado 4, di cui il glioblastoma ne è l'archetipo, esprime il massimo livello di malignità, caratterizzato da un indice di proliferazione cellulare aberrante, pleomorfismo cellulare con severe atipie nucleari, spiccata propensione all'infiltrazione diffusa del parenchima cerebrale sano, intensa angiogenesi e ampie aree di necrosi intratumorale.

Profili fisiopatologici e *network* molecolari aberranti

La fisiopatologia del glioblastoma è definita da un'elevata complessità eziopatogenetica, governata dall'interazione sinergica di alterazioni genetiche, epigenetiche e trascrittomiche. Questo *network* aberrante orchestra i fenotipi maligni cardine della neoplasia: l'estrema invasività parenchimale, l'angiogenesi massiva, la genesi di edema vasogenico pericellulare e un microambiente fortemente immunosoppressivo. Tali processi, cooperando tra loro, sostengono la proliferazione tumorale indefinita e determinano la refrattarietà ai presidi terapeutici convenzionali.

Sotto il profilo dell'istogenesi, i modelli correnti ipotizzano che il glioblastoma tragga origine dalla trasformazione neoplastica di cellule staminali neurali (NSC) o di precursori gliali (NPC) residenti nelle nicchie neurogeniche (come la zona sottoventricolare). In seguito all'accumulo sequenziale di mutazioni oncogeniche, questi elementi acquisiscono una spiccata capacità infiltrativa nei confronti del parenchima cerebrale circostante. L'espansione clonale e la migrazione cellulare determinano severi fenomeni di necrosi endoteliale e la strutturazione di un microambiente tumorale marcatamente infiammatorio, riscontrabile istologicamente.

Un ruolo chiave nella progressione della patologia e nell'evasione terapeutica è svolto da una specifica sottopopolazione cellulare dotata di proprietà staminali, denominata *Cellule Staminali del Glioblastoma* (GSC). Le GSC sono contraddistinte da pluripotenza, capacità di autorinnovamento (*self-renewal*) e un elevato potenziale tumorigenico *in vivo*. Tali proprietà biologiche alimentano il fenotipo aggressivo del tumore, perpetuandone la cinetica proliferativa, esaltandone l'invasività e promuovendo la resistenza intrinseca ai danni genotossici e citotossici indotti dalla radio e dalla chemioterapia. Di conseguenza, le GSC sono considerate le principali responsabili della prognosi infausta del GB e della sistematica insorgenza di recidive precoci.

L'isolamento e la caratterizzazione fenotipica di questa nicchia cellulare aprono prospettive cruciali per l'identificazione di nuovi *target* molecolari, nonché per la ridefinizione dei *pathway* di segnalazione che governano la staminalità tumorale (Gaiaschi et al., 2024).

Disregolazione dei *pathway* di sopravvivenza, del ciclo cellulare e immortalizzazione replicativa

La costellazione mutazionale del glioblastoma coinvolge molteplici vie di trasduzione del segnale. In circa l'80% dei casi clinici, si osserva un'alterazione funzionale dell'asse che comprende: i Recettori Tirosin-Chinasici (RTK), la Fosfatidilinositolo 3-Chinasi (PI3K) e l'oncosoppressore PTEN (Hu et al., 2022).

In condizioni fisiologiche, questa cascata molecolare modula: la divisione, la migrazione e la sopravvivenza cellulare, integrando stimoli extracellulari – fattori di crescita solubili, interazioni intercellulari e contatti con la matrice extracellulare (ECM) – mediati da recettori transmembrana, come: EGFR, PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) e le integrine.

Nei contesti neoplastici, l'attivazione costitutiva di questi recettori innesca cascate iper-proliferative di fosforilazione. Le alterazioni genetiche a carico di questo *pathway* determinano: un incremento della segnalazione pro-angiogenica, una deregolazione del ciclo cellulare e l'attivazione di meccanismi di motilità; inoltre, inducono un aumento patologico dei livelli basali del fattore inducibile dall'ipossia 1 alfa (HIF-1 α) (Hu et al., 2022).

Un'ulteriore alterazione critica, identificabile in circa il 40% dei glioblastomi, riguarda l'inattivazione del meccanismo di soppressione tumorale mediato dalla fosfoproteina oncosoppressore p53, imputabile a mutazioni puntiformi o a delezioni a carico del gene *TP53*.

In condizioni di omeostasi, p53 presiede all'integrità genomica regolando i *checkpoint* del ciclo cellulare in risposta a stress genotossici: essa induce un arresto transitorio del ciclo cellulare per consentire l'intervento dei macchinari di riparazione del DNA o, qualora il danno risulti strutturalmente irreparabile, attiva la via intrinseca dell'apoptosi. Nel glioblastoma, la funzione di p53 può essere compromessa anche indirettamente attraverso la sovraespressione di inibitori endogeni: MDM2, un evento frequentemente cooperato da alterazioni a carico del gene *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*) (Shah et al., 2024). Quest'ultimo, locus genico deputato alla codifica di regolatori che contrastano l'attività di MDM2 e MDM4, costituisce uno dei target di delezione omozigote più frequenti nel glioblastoma, riscontrabile in circa il 50% dei casi.

Parallelamente, nel 75% dei pazienti, si rileva una deregolazione strutturale del *pathway* della proteina del Retinoblastoma (Rb1). La forma ipofosforilata di Rb1 esercita un controllo negativo sulla progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, mantenendo le cellule in uno stato di quiescenza fisiologica; la sua inattivazione funzionale spezza questo blocco regolatorio, guidando la proliferazione replicativa incontrollata delle cellule neoplastiche.

L'acquisizione dell'immortalità replicativa nel GB è sostenuta, in circa l'80% dei casi, da mutazioni specifiche a carico del promotore della telomerasi (*TERTp*).

I telomeri costituiscono complessi nucleoproteici protettivi all'estremità dei cromosomi per preservarne la stabilità strutturale ed eludere i meccanismi di *DNA damage response*. La telomerasi, complesso ribonucleoproteico enzimatico, provvede all'aggiunta di sequenze ripetute esanucleotidiche all'estremità 3' cromosomica, contrastando il progressivo accorciamento dovuto al problema della replicazione terminale. Nel glioblastoma, le mutazioni di *TERTp* si localizzano stabilmente in due regioni hotspot situate a 124 bp e a 146 bp, a monte del codone d'inizio della traduzione del gene *TERT*, sul locus cromosomico 5p15.33 (corrispondenti alle varianti nucleotidiche C228T e C250T) (Olympios et al., 2021). Queste mutazioni transizionali generano motivi di legame *de novo* per i fattori di trascrizione della famiglia Ets, provocando un'*up-regulation* trascrizionale di TERT. Questo evento consente il mantenimento indefinito della lunghezza telomerica e conferisce una capacità proliferativa illimitata alle cellule tumorali. Data la loro elevata penetranza e specificità, tali varianti rivestono un ruolo diagnostico e prognostico centrale, integrato stabilmente nei correnti protocolli di classificazione molecolare dell'OMS.

Iper-vascularizzazione, amplificazione di EGFR e manifestazioni clinico-diagnostiche

Il glioblastoma si annovera tra i tumori umani a più alta densità vascolare; i processi di neoangiogenesi massiva e disregolata che lo caratterizzano ne giustificano l'inserimento tra le lesioni di alto grado. L'induzione del fenotipo angiogenico è guidata dall'attivazione trascrizionale mediata da HIF-1 α e dal conseguente rilascio del fattore di crescita endoteliale vascolare A (VEGF-A). Oltre alle condizioni chimico-fisiche locali del microambiente tumorale (l'ipossia profonda, l'acidosi intratumorale extracellulare, la concentrazione di citochine infiammatorie e fattori di crescita paracrini), anche le alterazioni genetiche intrinseche (tra cui: le mutazioni di *EGFR*, *IDH1*, *PTEN* e l'attivazione della via PI3K) concorrono a stabilizzare e a esaltare l'attività trascrizionale di HIF-alpha, inducendo una secrezione costitutiva di VEGF nel mezzo extracellulare.

Tra i principali motori di questa spinta oncogenica figura l'amplificazione del gene *EGFR*, riscontrata in circa il 57,4% dei casi di GB. La variante aberrante più comune è rappresentata dal mutante di delezione EGFRvIII, caratterizzato dalla perdita degli esoni 2-7 (corrispondenti agli amminoacidi 6-273), che genera un sito di giunzione alternativo con l'inserzione di un residuo di glicina tra le posizioni 5 e 274 (Zhu et al., 2025). Questa modificazione strutturale elimina completamente il dominio extracellulare di legame per il ligando, ma conserva intatti la regione transmembrana e il dominio tirosin-chinasico intracellulare, inducendo un'attivazione conformazionale costitutiva. L'omodimero transitorio di EGFRvIII viene stabilizzato dalla formazione di ponti disolfuro intercatena stabili, che coinvolgono i residui di cisteina ammino-terminali esposti dalla delezione (Zhu et al., 2025). Sebbene l'efficienza catalitica e la capacità di autofosforilazione di EGFRvIII siano quantitativamente inferiori rispetto al recettore *wild-type* attivato dal ligando (a causa di un *pattern* di fosforilazione incompleto dovuto a una parziale distorsione conformazionale), la sua segnalazione tonica – persistente e non soggetta a meccanismi di *down-regulation* o a internalizzazione recettoriale – è sufficiente a guidare la trasformazione neoplastica. EGFRvIII recluta e attiva in modo costitutivo le vie di segnalazione a valle RAS/MAPK, PI3K/AKT e JAK/STAT, promuovendo la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'induzione della motilità e nella resistenza ai regimi terapeutici (Hu et al., 2022). L'insieme di queste aberrazioni genetiche e la persistenza di circuiti proliferativi molecolari non coordinati si traducono, dal punto di vista clinico, in una delle patologie più aggressive e refrattarie dell'intero panorama oncologico. Proprio la transizione da alterazioni genomiche intrinseche a fenotipi invasivi macroscopici ha storicamente limitato l'efficacia dei trattamenti standard, spingendo la neuro-oncologia moderna a sviluppare strategie terapeutiche combinate e approcci multimodali nel tentativo di aggredire contemporaneamente i molteplici meccanismi di sopravvivenza del tumore.

1.2 Trattamento e approcci terapeutici convenzionali e innovativi

Il glioblastoma rappresenta una delle sfide più complesse dell'oncologia moderna. La marcata resistenza intrinseca e acquisita alle terapie convenzionali, l'eterogeneità clonale e l'elevata invasività biologica determinano una prognosi generalmente infausta. A livello clinico, l'attuale standard terapeutico è basato su un approccio multimodale che prevede una resezione chirurgica quanto più estesa e massimale possibile, seguita da un regime combinato di radioterapia e chemioterapia concomitante e successiva adiuvante (Roda & Bottone, 2022). Nonostante l'aggressività di questo intervento combinato, l'esito clinico rimane severo, con una sopravvivenza mediana globale di circa 15 mesi e un tasso di sopravvivenza a due anni che si attesta intorno al 26,5%. Tali insuccessi sono imputabili sia alla localizzazione anatomica infiltrante del tumore, che impedisce una completa eradicazione chirurgica dei margini, sia alla presenza di barriere fisiologiche e meccanismi molecolari di chemioresistenza. Inoltre, l'impiego a lungo termine di agenti alchilanti tradizionali e inibitori angiogenici determina l'insorgenza di una severa neurotossicità cumulativa dose-dipendente, limitando l'efficacia terapeutica complessiva. Dal 2005, lo standard di cura internazionale è dettato dal cosiddetto "Protocollo Stupp", il quale ha sancito l'introduzione della temozolomide (TMZ) in concomitanza con la radioterapia frazionata (Stupp et al., 2005). L'evidenza clinica consolidata negli ultimi vent'anni ha ampiamente dimostrato che la monoterapia non è in grado di contrastare efficacemente la progressione della malattia. Di conseguenza, la ricerca oncologica si è orientata verso lo sviluppo di strategie combinatorie e approcci terapeutici *multi-target*, volti a colpire simultaneamente i diversi pathway molecolari implicati nella tumorigenesi e nella plasticità metabolica cellulare.

L'agente alchilante d'elezione: la Temozolomide (TMZ)

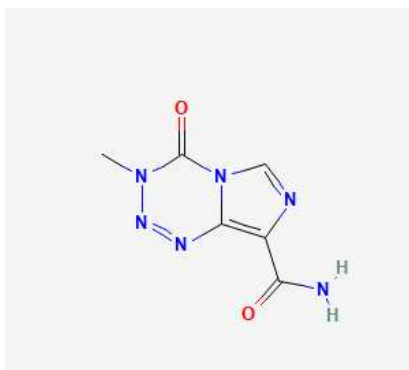


Figura 2: Struttura chimica bidimensionale della Temozolomide (8-carbamoyl-3-metilimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one), evidenziante lo scheletro eterociclico responsabile dell'idrolisi spontanea a pH fisiologico.

La TMZ è un profarmaco lipofilo orale appartenente alla classe degli agenti alchilanti, in grado di superare efficacemente la barriera ematoencefalica (BBB), superando uno dei principali ostacoli chemioterapici nel sistema nervoso centrale. Il suo meccanismo d'azione si esplica attraverso la citotossicità mediata dall'alchilazione e dalla metilazione del DNA, in particolare in corrispondenza della posizione O^6 della guanina, inducendo l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M e la conseguente attivazione dell'apoptosi. Il regime terapeutico standard prevede una fase concomitante con la radioterapia alla dose di 75 mg/m² al giorno, per un massimo di sette settimane, seguita da una fase adiuvante che prevede dosi cicliche di 150-200 mg/m², per cinque giorni ogni ciclo di 28 giorni, per un totale di sei cicli consecutivi. Nonostante una risposta iniziale favorevole, l'insorgenza di chemioresistenza alla TMZ è un evento quasi sistematico, che porta oltre il 90% dei pazienti a sviluppare recidive precoci. Il principale determinante molecolare di tale resistenza è l'espressione dell'enzima di riparazione del DNA O^6 -metilguanina-DNA metiltrasferasi (MGMT).

Nei pazienti in cui il promotore del gene MGMT risulta epigeneticamente silenziato tramite metilazione, i livelli enzimatici sono minimi, garantendo una maggiore suscettibilità al farmaco e una sopravvivenza significativamente più lunga. Al contrario, uno stato non metilato del promotore induce un'iper-espressione di MGMT, consentendo la rimozione immediata dei gruppi alchilici inseriti dalla TMZ e attivando i sistemi di riparazione del danno genomico (DDR) (Tomar et al., 2021). A questo, si associano meccanismi di resistenza epigenetica mediati da profili alterati di microRNA, come: la *downregulation* di miR-34a o l'*upregulation* di miR-1246; l'iper-attivazione dei trasportatori di efflusso ABC, che riducono la concentrazione intracellulare del chemioterapico e la stimolazione di processi autofagici protettivi indotti dallo stress terapeutico.

Limiti e prospettive dei composti platinanti: il Cisplatino

Al fine di aggirare le resistenze biologiche associate ai farmaci alchilanti come la TMZ, la ricerca clinica ha preso in esame l'utilizzo di agenti citotossici dotati di un differente meccanismo d'azione sul genoma, tra cui spiccano i composti di coordinazione del platino. Il cisplatino (cis-diamminodichloroplatino(II), CDDP) è un potente agente chemioterapico ampiamente utilizzato nei tumori solidi, capace di esercitare un'azione citotossica sia sulle cellule in attiva proliferazione sia su quelle in stato di quiescenza. Il suo meccanismo d'azione si basa sulla formazione di legami covalenti stabili tra l'atomo centrale di platino e la posizione N7 delle purine (adenina e guanina), generando addotti intra-strand e inter-strand, che distorcono la doppia elica del DNA (Jeon et al., 2021).

Tali lesioni strutturali attivano una complessa cascata di segnali molecolari, che coinvolge la proteina cromatinica HMGB1 e l'oncosoppressore p53, promuovendo il blocco della trascrizione e l'attivazione dell'apoptosi. Nonostante l'elevata efficacia citotossica *in vitro*, l'impiego clinico del cisplatino nel GB è fortemente limitato da una severa tossicità sistemica (nefrotossicità ed epatotossicità) e dalla sua scarsa capacità di penetrazione attraverso la barriera ematoencefalica, dove tende a formare complessi acquosi carichi, che ne bloccano il passaggio idrofobico (Hagiwara et al., 2023). Inoltre, le cellule di glioblastoma sviluppano rapidamente resistenza al CDDP mediante l'inattivazione funzionale di TP53 e l'attivazione aberrante della via delle MAPK (Natu et al., 2024).

Strategie di design molecolare per il superamento dei limiti cinetici: i complessi complanari Pt(IV)Ac-POA e Pt(acac)₂(DMS)

Al fine di superare i severi limiti farmacocinetici e clinici associati all'impiego del cisplatino convenzionale – principalmente legati alla scarsa penetrazione idrofobica attraverso la barriera ematoencefalica e alla suscettibilità verso i meccanismi di chemioresistenza epigenetica o molecolare – la ricerca del nostro gruppo ha validato lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative basate su profarmaci del Platino ad azione mirata (Gaiaschi et al., 2025). Le cellule di glioblastoma presentano infatti una spiccata capacità di eludere i *pathway* apoptotici canonici e di orchestrare complessi meccanismi di riparazione del danno al DNA, rendendo l'alchilazione indotta dai chemioterapici standard ampiamente inefficace nel lungo termine (Gaiaschi et al., 2025). In questo scenario, la transizione verso la progettazione di profarmaci ottaedrici del Platino nella forma di ossidazione (IV) offre la possibilità di coniugare un'elevata inerzia cinetica nel compartimento sistemico con un rilascio selettivo e citotossico della specie attiva di Platino (II) solo all'interno del microambiente tumorale riducente (Gaiaschi et al., 2022). Questa modulazione molecolare fine permette di limitare drasticamente la tossicità sistemica e la resistenza intrinseca, aprendo la strada a protocolli adiuvanti sinergici in grado di combinare la chemioterapia classica con approcci fito-micoterapici avanzati mirati a scardinare la plasticità metabolica tumorale (Gaiaschi et al., 2024).

Nell'ambito delle linee di ricerca sviluppate dal nostro laboratorio, l'attenzione sperimentale si è focalizzata sulla caratterizzazione di due specifiche architetture molecolari complanari, specificamente ingegnerizzate per superare la resilienza biologica del glioblastoma:

- **Pt(IV)Ac-POA:** Questo profarmaco ottaedrico, chimicamente identificato come *(OC-6-44)-acetato(palmitato)diamminedichloridoplatino(IV)*, rappresenta un candidato di punta per i trattamenti chemioterapici di nuova generazione (Ferrari et al., 2021). Il design di questo

complesso prevede la funzionalizzazione assiale del nucleo platinante con una catena lipofila di acido palmitico (POA), concepita per incrementare in modo esponenziale l'idrofobicità complessiva della molecola (Ferrari et al., 2021). Tale modificazione strutturale favorisce in modo cruciale il superamento della barriera ematoencefalica per diffusione passiva, permettendo al farmaco di accumularsi selettivamente nel bulk tumorale e di indurre una massiva tossicità cellulare superando i limiti del cisplatino (Ferrari et al., 2021). Sotto il profilo del meccanismo d'azione biologico, l'esposizione al Pt(IV)Ac-POA determina un esteso e severo danno a carico del compartimento mitocondriale, alterando l'omeostasi dell'organello e inducendo un processo di morte cellulare programmata che esibisce le caratteristiche morfologiche e molecolari tipiche della necroptosi (Ferrari et al., 2021; Gaiaschi et al., 2023).

- **Pt(acac)₂(DMS) o PtAcacDMS:** Questo complesso di coordinazione innovativo si differenzia radicalmente dai farmaci platinanti classici per la presenza, nella sfera di coordinazione del metallo, di due legandi acetilacetoni (acac) e di una molecola di dimetilsolfossido (DMS) (Artesana et al., 2020). L'introduzione di questa specifica architettura chimica è stata specificamente studiata per aggirare i meccanismi di resistenza e ridurre i severi effetti collaterali legati alla terapia convenzionale con cisplatino (Muscella et al., 2020). Una volta internalizzato, il Pt(acac)₂(DMS) esercita un'azione citotossica multimodale estremamente potente, dimostrando un'efficacia preclinica significativamente superiore rispetto al cisplatino tradizionale attraverso l'induzione di un massivo e aberrante squilibrio dell'omeostasi del calcio intracellulare (Artesana et al., 2020). Studi recenti condotti sulla linea cellulare di glioblastoma umano U251 hanno dimostrato che il meccanismo d'azione del Pt(acac)₂(DMS) è strettamente legato all'innescamento di una profonda disfunzione mitocondriale e al blocco selettivo delle vie autofagiche cellulari, determinando un blocco bioenergetico distruttivo che conduce la cellula neoplastica al collasso (Gaiaschi et al., 2026).

L'inclusione di Pt(IV)Ac-POA e Pt(acac)₂(DMS) nel disegno sperimentale del presente lavoro permette dunque di confrontare l'efficacia di queste diverse architetture molecolari rispetto ai farmaci standard (Cisplatino e Temozolomide), valutandone l'impatto sulla sopravvivenza cellulare alla dose subletale (IC₂₅) e sulla modulazione dei livelli di marcatori proteici chiave legati allo stress e all'importazione del glucosio (Gaiaschi et al., 2026).

Approcci terapeutici integrati: Fitocomplessi, Micoterapia e il derivato Pt(IV)Ac-GA

Negli ultimi anni, la ricerca oncologica ha progressivamente rivolto l'attenzione verso approcci terapeutici integrati e multifattoriali, con l'obiettivo di superare la complessità biologica e la marcata eterogeneità clonale del glioblastoma. Le terapie combinate rappresentano una delle strategie più promettenti, poiché mirano a colpire simultaneamente diversi bersagli molecolari e vie di segnalazione intracellulari coinvolte nella proliferazione, nell'invasività e nella resistenza ai trattamenti convenzionali (Gaiaschi et al., 2024). Parallelamente, le medicine complementari e integrative (CIM) hanno ricevuto crescente attenzione in neuro-oncologia, in particolare per quanto riguarda l'impiego razionale di fitoterapici e micoterapici in combinazione e a supporto dei protocolli standard (Gaiaschi et al., 2024). Numerosi composti bioattivi naturali hanno infatti dimostrato spiccate proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, immunomodulanti e antitumorali, rivelando un potenziale sinergico capace di incrementare l'efficacia citotossica dei farmaci e, al contempo, attenuare la tossicità sistemica (Gaiaschi et al., 2024). A livello fitoterapico, una vasta gamma di molecole di origine vegetale — tra cui l'acido betulinico, la berberina, la quercetina, il resveratrolo, la curcumina e la polidatina — ha mostrato una citotossicità selettiva verso le linee cellulari di glioblastoma, agendo in modalità multi-target su *pathway* cruciali di sopravvivenza. Ad esempio, l'acido betulinico induce un arresto programmato del ciclo cellulare e una marcata citotossicità selettiva risparmiando gli astrociti sani (Silva et al., 2020), mentre la berberina è in grado di abbattere la viabilità cellulare forzando l'apoptosi anche in cloni tumorali refrattari ai meccanismi di morte convenzionali (Palma et al., 2020). L'interferenza con il microambiente tumorale e le nicchie staminali viene efficacemente operata dal flavonoide quercetina, il quale inibisce l'asse di segnalazione pro-infiammatorio Ax1/IL-6/STAT3 (Kim et al., 2021). Altrettanto innovativi sono gli studi condotti su composti polifenolici in grado di interagire con la proteina EIF4A3, suggerendo un effetto soppressivo epigenetico sulla traduzione di RNA oncogenici coinvolti nella progressione maligna (Kulavi et al., 2025). La frontiera più avanzata della fitoterapia applicata al glioblastoma risiede tuttavia nella co-somministrazione sinergica finalizzata a superare le chemioresistenze intrinseche, come la resistenza alla TMZ. In questo contesto, l'associazione tra il polifenolo resveratrolo e agenti citotossici potenzia significativamente l'attività della caspasi-3 e reprime la via Wnt/ β -catenina, consentendo di massimizzare gli effetti antitumorali a dosaggi inferiori (Zou et al., 2024). Analogamente, il muscone si è dimostrato capace di eludere la chemioresistenza alla TMZ inducendo anoikis e danno al DNA tramite il blocco dell'asse integrina β 1/FAK/EGFR (Zou et al., 2024), mentre la combinazione molecolare di curcumina e polidatina interviene direttamente sulla down-regulation dell'enzima MGMT alterando i processi autofagici cellulari (Serafino et al., 2024).

Infine, approcci combinati basati sull'utilizzo di derivati dell'acido oleanolico, come il soloxolone para-metilanilide, o l'impiego sinergico di cannabidiolo (CBD) e molecole anti-infiammatorie, hanno confermato la capacità di innescare una massiccia produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e attivare la via Nrf2, compromettendo la migrazione e l'invasività delle cellule tumorali sia in vitro che in modelli murini complessi (Odarenko et al., 2024; Rybarczyk et al., 2025).

In stretta convergenza biologica con il panorama fitoterapico si colloca l'ampio filone della micoterapia oncologica. I funghi medicinali – in particolare specie macromicetiche quali *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* e *Cordyceps sinensis* – costituiscono una fonte straordinaria di macromolecole bioattive come polisaccaridi ad alto peso molecolare, triterpenoidi, steroli e composti fenolici (Gaiaschi et al., 2024). I β -glucani fungini esercitano un'azione immunomodulante indiretta, legandosi ai recettori Dectin-1 e TLR di macrofagi e cellule NK, stimolando così una risposta immunitaria immunogenica contro la massa neoplastica (Varnosfaderani et al., 2024).

Al contempo, i triterpeni acidi e i fenoli estratti da queste specie esercitano un attacco citotossico diretto sulle cellule di glioblastoma: essi reprimono l'asse iperattivato PI3K/Akt/mTOR e spengono l'attività pro-survival del fattore NF- κ B, inducendo l'arresto del ciclo cellulare e attivando la via apoptotica mitocondrio-dipendente (Gaiaschi et al., 2024). In contesti terapeutici combinati, gli estratti micoterapici hanno dimostrato la peculiare capacità di cooperare con i chemioterapici alchilanti e platinanti, modulando l'omeostasi redox e forzando meccanismi multipli e paralleli di morte immunogenica, quali l'apoptosi, la necroptosi e la ferroptosi ROS-dipendente (Gaiaschi et al., 2024). Nonostante la solida efficacia teorica di queste co-somministrazioni disgiunte, la reale applicazione clinica sbatte sistematicamente contro i limiti farmacocinetici dei singoli composti naturali, caratterizzati da una bassa biodisponibilità, rapido metabolismo sistemico e, soprattutto, da una differente capacità di attraversamento della barriera ematoencefalica (Gaiaschi et al., 2024). Per superare la barriera cinetica della somministrazione di farmaci separati e garantire un rilascio stechiometricamente perfetto e simultaneo nel sito tumorale, la moderna ingegneria farmaceutica ha sviluppato una strategia di coniugazione covalente intramolecolare (Gaiaschi et al., 2024).

Sulla base di questo innovativo razionale biochimico è stato progettato e sintetizzato il fulcro sperimentale del presente lavoro: un nuovo complesso metallo-organico a base di platino (IV), denominato **Pt(IV)Ac-GA**, chimicamente identificato come (OC-6-44)-acetato(β -ganoderate)diamminedichlorido-platino(IV). Questo profarmaco ottaedrico viene ottenuto legando covalentemente il diacetato di platino(IV) con l'**acido ganoderico A (GA-A)**, un triterpenoide tetraciclico appartenente alla classe dei lanostani isolato proprio dal fungo medicinale *Ganoderma lucidum*.

Il GA-A, preso come agente singolo, ha ampiamente documentato nei modelli di glioblastoma una spiccata capacità di inibire la proliferazione, la migrazione e l'invasività cellulare, inducendo l'apoptosi mediante la severa inibizione della via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR, con conseguente crollo dei livelli intracellulari di Akt fosforilato, mTOR e ciclina D1, e la concomitante attivazione della cascata litica Bax/caspasi-3 (Yang et al., 2018). Inoltre, in modelli preclinici di neoplasie aggressive del sistema nervoso centrale, il GA-A ha dimostrato un'intrinseca attività neuroprotettiva combinata a una forte induzione di stress ossidativo ROS-dipendente e all'inattivazione della via oncogenica JAK2/STAT3 (Yang et al., 2018). La fusione intramolecolare del nucleo citotossico del platino con lo scheletro triterpenico del GA-A nel complesso Pt(IV)Ac-GA permette quindi di capitalizzare la selettività metabolica e l'azione *multi-target* della micoterapia, potenziando drasticamente l'efficacia antineoplastica all'interno del microambiente tumorale e minimizzando al contempo il danno biologico a carico del tessuto cerebrale sano (Gaiaschi et al., 2024).

Frontiere delle terapie biologiche mirate: Anticorpi Monoclonali, Inibitori Tirosin-Chinasici e Immunoterapia

L'avvento della medicina di precisione nel trattamento del glioblastoma ha guidato lo sviluppo di una vasta gamma di agenti mirati contro i recettori tirosin-chinasici (RTK) e le complesse reti di segnalazione intracellulare deregolati nella patologia (Hu et al., 2022). Le mutazioni strutturali e le amplificazioni geniche a carico di questi recettori ne alterano la conformazione, eludendo i normali meccanismi di controllo e guidando una segnalazione iperproliferativa e metabolica cronica (Hu et al., 2022).

Una delle strategie più investigate è il blocco della massiccia neoangiogenesi tumorale, un tratto distintivo del GB mediato dal fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Il capostipite di questa classe, il **Bevacizumab**, è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il VEGF-A solubile; legandosi ad esso, impedisce l'interazione con i recettori endoteliali VEGFR-1 e VEGFR-2, determinando una rapida normalizzazione della permeabilità vascolare e una netta riduzione dell'edema cerebrale vasogenico, sebbene il suo reale impatto sulla sopravvivenza globale rimanga oggetto di dibattito clinico (Zhu et al., 2025). Oltre al Bevacizumab, la ricerca ha esteso lo studio a inibitori tirosin-chinasici (TKI) multichinasici a spettro più ampio, come il **Cediranib** e il **Regorafenib**, concepiti per colpire contemporaneamente i recettori VEGFR, PDGFR e FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), nel tentativo di aggirare le vie di fuga angiogeniche della massa tumorale (Zhu et al., 2025).

Parallelamente alla via angiogenica, l'asse del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) rappresenta uno dei target prioritari. Oltre alla variante oncogenica costitutivamente attiva EGFRvIII, il GB presenta frequentemente l'iperespressione dell'EGFR *wild-type*. Per spegnere questo segnale proliferativo, sono stati testati sia anticorpi monoclonali mirati come il **Cetuximab** e il **Panitumumab**, sia TKI di prima e seconda generazione, quali **Erlotinib**, **Gefitinib** e **Lapatinib**, volti a inibire la tasca catalitica intracellulare del recettore e la conseguente cascata di fosforilazione a valle (Hu et al., 2022; Zhu et al., 2025). La resistenza intrinseca a questi agenti ha spinto la sperimentazione verso inibitori di terza generazione e irreversibili, come l'**Osimertinib**, capace di crossare efficacemente la barriera ematoencefalica. In stretta associazione a EGFR, un altro recettore cruciale è **c-Met** (Hepatocyte Growth Factor Receptor), spesso co-attivato e responsabile della transizione verso un fenotipo mesenchimale altamente invasivo; inibitori di c-Met come il **Crizotinib** e il **Cabozantinib** sono stati introdotti nei protocolli sperimentali proprio per bloccare questo specifico meccanismo di chemioresistenza (Hu et al., 2022). Per ovviare al fallimento terapeutico dei singoli inibitori recettoriali, causato dalla forte eterogeneità clonale, l'attenzione della ricerca si è focalizzata sul blocco dei nodi di segnalazione intracellulare intracitoplasmatici, dove convergono i segnali di molteplici RTK. In questo contesto, sono stati sviluppati e testati inibitori specifici del pathway PI3K/Akt/mTOR. Tra questi, gli inibitori allosterici di mTORC1, come il **Temsirolimus** e l'**Everolimus**, hanno mostrato la capacità di arrestare la progressione del ciclo cellulare, sebbene la loro efficacia clinica sia stata limitata dall'attivazione compensatoria di Akt mediata da mTORC2 (Gaiaschi et al., 2024). Ciò ha guidato il design molecolare verso inibitori duali PI3K/mTOR, come il **Buparlisib** (BKM120) o il **Dactolisib** (BEZ235), capaci di indurre un blocco metabolico e proliferativo più profondo e privo di circuiti di *feedback* positivi (Gaiaschi et al., 2024).

Infine, l'orizzonte delle terapie biologiche si è esteso radicalmente verso l'immunoterapia oncologica avanzata, suddivisa principalmente in immunoterapia passiva tramite *checkpoint inhibitors* e immunoterapia attiva mediante vaccini. I *checkpoint* inibitori, come il **Nivolumab** e il **Pembrolizumab** (anticorpi monoclonali diretti contro il recettore PD-1) o l'**Atezolizumab** (diretto contro il ligando PD-L1), sono stati progettati per interrompere il segnale di immunosoppressione esercitato dalle cellule di glioblastoma nei confronti dei linfociti T infiltranti il tumore (TILs), riattivando la citotossicità immunitaria contro la massa neoplastica (Zhu et al., 2025). Sul fronte dei vaccini peptidici, il **Rindopepimut** (CDX-110) rappresenta l'approccio più specifico contro l'eterogeneità del GB: si tratta di un vaccino terapeutico mirato contro la specifica sequenza aminoacidica neoformata della giunzione di splicing di EGFRvIII, capace di innescare una risposta immunitaria umorale e cellulare altamente selettiva contro i cloni tumorali esprimenti la mutazione (Hu et al., 2022).

Tuttavia, come ampiamente documentato, la straordinaria plasticità cellulare, l'attivazione di vie metaboliche collaterali e il microambiente fortemente immunosoppressivo del glioblastoma limitano drasticamente il successo di ciascuno di questi composti biologici usati come agenti singoli (Gaiaschi et al., 2024). In questo complesso scenario, l'integrazione di anticorpi monoclonali, TKI e immunoterapici all'interno di regimi multifattoriali e combinati rappresenta l'unica via biochimicamente fondata per scardinare la resistenza biologica della neoplasia (Gaiaschi et al., 2024). Tuttavia, l'efficacia clinica e lo sviluppo di queste innovative architetture molecolari – siano esse agenti mirati, immunoterapici o complessi metallo-organici multifunzionali – non dipendono esclusivamente dalla loro affinità per i target di superficie o per il DNA cellulare. La vera barriera biologica che determina il successo o il fallimento di tali composti risiede nella capacità di intercettare e scardinare l'intimo riprogramma bioenergetico profondo che alimenta la massa tumorale.

1.3 Il metabolismo energetico tumorale e l'Effetto Warburg: ruolo delle principali vie di segnalazione alterate nel GB

La progressione biologica del glioblastoma è intimamente legata a una profonda riprogrammazione del metabolismo energetico cellulare: un fenomeno coordinato dall'iper-attivazione aberrante delle principali vie di trasduzione del segnale (Lan et al., 2024).

Nelle cellule sane del sistema nervoso centrale, la produzione di energia dipende principalmente dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale (OXPHOS); al contrario, le cellule di GB deviano radicalmente il proprio assetto biochimico verso la glicolisi anaerobia, convertendo il glucosio in lattato anche in condizioni di normale ossigenazione atmosferica (Strickland & Stoll, 2017).

Questo fenomeno, noto come “Effetto Warburg”, pur producendo una quantità di adenosina trifosfato (ATP) inferiore rispetto alla respirazione mitocondriale, garantisce una velocità di produzione energetica estremamente elevata e fornisce gli intermedi carboniosi indispensabili per la sintesi *de novo* di macromolecole, necessarie a sostenere la rapidità della crescita tumorale (Strickland & Stoll, 2017) (Figura 3).

Warburg effect

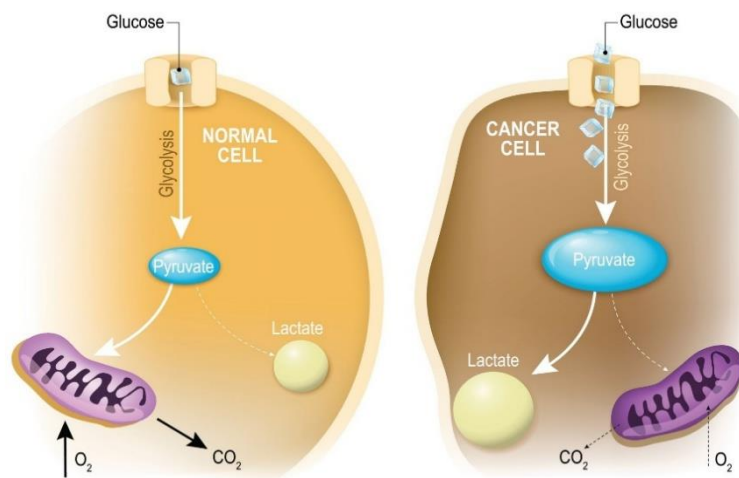


Figura 3: Rappresentazione schematica dello switch glicolitico (Effetto Warburg) nel tessuto neoplastico rispetto all'omeostasi cellulare normale. (Fonte: Strickland & Stoll, 2017).

Pathway dei Recettori Tirosin-Chinasici (RTK) e l'asse PI3K/Akt/mTOR

La segnalazione tramite i recettori tirosin-chinasici (RTK), quali EGFR, PDGFR e VEGFR, rappresenta la via di trasduzione più frequentemente alterata nel glioblastoma IDH-*wildtype* (Lan et al., 2024). L'iperattivazione di questi recettori transmembrana, mediata da mutazioni conformazionali o amplificazioni geniche, innesca la cascata intracellulare PI3K/Akt/mTOR: un asse centrale che controlla direttamente la crescita, la sopravvivenza e il metabolismo cellulare (Pouyan et al., 2025). Una volta attivata dal reclutamento alla membrana plasmatica, la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) catalizza la conversione del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) in fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato (PIP3), un secondo messaggero lipidico che recluta e attiva la serin-treonin chinasi Akt (Pouyan et al., 2025).

Nel contesto del glioblastoma, mutazioni nel gene *PIK3CA* (che codifica la subunità catalitica p110 α della PI3K) sono riportate nel 4-27% dei casi e la sua iperattivazione sostiene direttamente la migrazione cellulare e la chinasi di adesione focale FAK (Pouyan et al., 2025). Dal punto di vista biochimico, l'iperattivazione cronica dell'asse PI3K/Akt/mTOR agisce come il principale interruttore molecolare e coordinatore metabolico dell'Effetto Warburg (Strickland & Stoll, 2017).

La protein-chinasi Akt (chiamata anche Protein Chinasi B, PKB) stimola il flusso glicolitico attraverso un duplice meccanismo, diretto e indiretto, che ottimizza sia l'apporto di substrato sia l'efficienza catalitica della cascata enzimatica (Strickland & Stoll, 2017).

In primo luogo, Akt promuove attivamente la traslocazione sulla membrana plasmatica dei trasportatori facilitati del glucosio, in particolare di GLUT1, orchestrando il traffico vescicolare intracellulare (Strickland & Stoll, 2017). Sotto lo stimolo iperattivato del *pathway*, Akt fosforila la proteina attivante la GTPasi AS160 (Akt Substrate of 160 kDa), inibendone la funzione di blocco; questo evento biochimico permette il passaggio delle GTPasi Rab alla loro forma attiva legata al GTP, innescando l'esocitosi e la fusione delle vescicole di storage citoplasmatico cariche di GLUT1 con la membrana cellulare, incrementando così drasticamente l'*uptake* basale di esoso da parte della cellula neoplastica (Strickland & Stoll, 2017). In secondo luogo, Akt interviene direttamente sul controllo cinetico della glicolisi, fosforilando enzimi glicolitici chiave nei loro siti regolatori (Strickland & Stoll, 2017).

Tra questi, l'esochinasi di tipo 2 (HK2) viene fosforilata da Akt in corrispondenza del residuo di treonina 473, un evento che ne stimola il legame fisico con la porina VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) sulla membrana mitocondriale esterna; tale compartimentalizzazione strategica garantisce all'enzima un accesso preferenziale e immediato all'ATP neosintetizzato dai mitocondri, accelerando la reazione di prima fosforilazione del glucosio a glucosio-6-fosfato e prevenendo il *feedback* inibitorio (Strickland & Stoll, 2017). Inoltre, Akt favorisce l'attività catalitica della fosfofruttochinasi-2 (PFK2), determinando un aumento dei livelli di fruttosio-2,6-bisofosfato, il più potente attivatore allosterico della fosfofruttochinasi-1 (PFK1), che agisce così da vero e proprio acceleratore del commitment glicolitico tumorale (Strickland & Stoll, 2017). A valle di questa cascata cinetica, il complesso multiproteico mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) funge da sensore e integratore metabolico aberrante, traducendo l'abbondanza di nutrienti e di segnali proliferativi in un programma trascrizionale di riprogrammazione energetica (Strickland & Stoll, 2017). L'iperattivazione di mTORC1 incrementa la traduzione e la stabilità di HIF-1 α attraverso la modulazione dei suoi effettori a valle, come: la chinasi p70S6K e la proteina inibitoria 4E-BP1, inducendo la sintesi proteica di HIF-1 α anche in perfette condizioni di normossia atmosferica (Strickland & Stoll, 2017). Questo specifico fenomeno di "pseudo-ipossia" oncogenica consente al fattore trascrizionale di dimerizzare stabilmente con la subunità costitutiva HIF-1 β , traslocare nel nucleo e legarsi specificamente alle sequenze HRE (*Hypoxia Response Elements*) localizzate nei promotori genetici (Strickland & Stoll, 2017). Il *network* genico attivato da questo legame induce la trascrizione coordinata dei geni deputati alla strutturazione del sistema di trasporto del glucosio, esaltando ulteriormente l'espressione di GLUT1 e GLUT3 e inducendo la sintesi massiva dell'enzima lattato deidrogenasi A (LDHA) e del trasportatore monocarbossilato 4 (MCT4), passaggi biochimici obbligati per convertire rapidamente il piruvato in lattato ed espellerlo nel mezzo extracellulare al fine di preservare l'omeostasi del pH citoplasmatico (Strickland & Stoll, 2017).

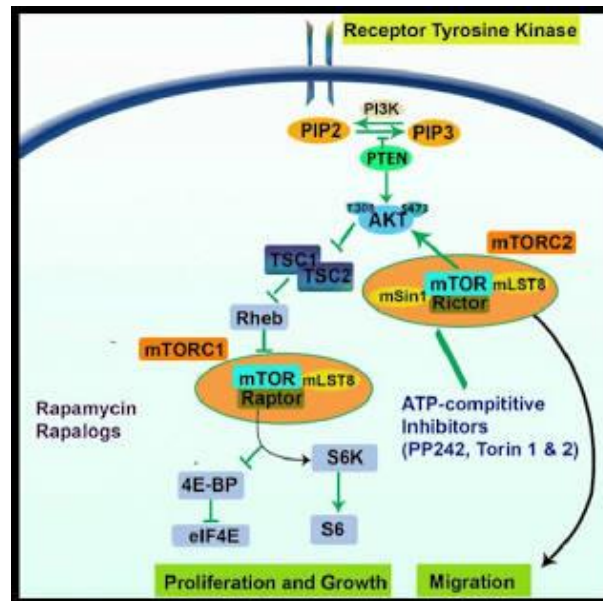


Figura 4: Mappa molecolare dell'asse di segnalazione RTK/PI3K/Akt/mTOR e dei complessi effettori intracellulari associati alla progressione del GB. (Fonte: Strickland & Stoll, 2017).

Oncosoppressori e checkpoint: i *pathway* di p53 e RB

La via del soppressore tumorale TP53 risulta deregolata nell'84% dei pazienti affetti da GB e nel 94% delle linee cellulari tumorali, principalmente a causa di mutazioni inattivanti o dell'amplificazione dell'oncogene MDM2, il quale promuove la degradazione di p53 via proteasoma (Pouyan et al., 2025; Lan et al., 2024). Parallelamente, la via del retinoblastoma (RB) controlla la progressione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, mediante l'inibizione dei fattori di trascrizione E2F (Lan et al., 2024). Nel glioblastoma, la perdita di funzione di *RB1*, la delezione omozigote del locus *CDKN2A* (presente nel 58% dei casi) o l'amplificazione delle chinasi ciclina-dipendenti CDK4/6 comportano l'evasione dai checkpoint cellulari e una proliferazione incontrollata (Lan et al., 2024).

Oltre alle note funzioni di blocco del ciclo cellulare, l'inattivazione combinata di p53 e della via di RB esercita un impatto drammatico sul riprogramma energetico del GB (Strickland & Stoll, 2017).

In condizioni fisiologiche, la proteina oncosoppressrice p53 *wild-type* agisce come un potente regolatore omeostatico e come un freno molecolare nei confronti della glicolisi anaerobia, coordinando una complessa rete trascrizionale volta a reprimere l'espressione dei trasportatori facilitati del glucosio GLUT1 e GLUT3 e a stimolare, di contro, la respirazione mitocondriale e la fosforilazione ossidativa (Strickland & Stoll, 2017).

Questo controllo metabolico diretto si esplicita sia attraverso il legame repressivo di p53 sui promotori genici dei GLUT, sia mediante l'attivazione trascrizionale di bersagli chiave come TIGAR (*TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator*), un enzima che degrada i livelli intracellulari di fruttosio-2,6-bisfosfato, rallentando l'attività della fosfofruttochinasi-1 (PFK1) e dirottando il flusso del glucosio-6-fosfato verso la via dei pentoso-fosfati per sostenere le difese antiossidanti della cellula (Strickland & Stoll, 2017). Inoltre, p53 promuove la via mitocondriale inducendo l'espressione di SCO2 (*Synthesis of Cytochrome c Oxidase 2*), una proteina essenziale per il corretto assemblaggio del complesso IV della catena di trasporto degli elettroni (Strickland & Stoll, 2017). La perdita mutazionale o l'inattivazione funzionale di p53 nel glioblastoma rimuove bruscamente questo blocco trascrizionale e biochimico, determinando non solo l'*upregulation* incondizionata dei trasportatori del glucosio, ma anche la deregolazione dell'asse NF- κ B, che esalta ulteriormente la trascrizione di GLUT1 (Strickland & Stoll, 2017). Questo switch metabolico priva la cellula del controllo sull'apporto di esoso e accelera l'instaurarsi dell'Effetto Warburg, inducendo una massiccia produzione di lattato a scapito dell'efficienza energetica mitocondriale (Strickland & Stoll, 2017). Contemporaneamente, l'attivazione costitutiva e libera dei fattori trascrizionali della famiglia E2F, indotta dalla perdita della via regolatoria del retinoblastoma (RB) causata da mutazioni, delezioni di CDKN2A/B o iperattivazione delle chinasi ciclina-dipendenti CDK4/6, stabilisce un legame indissolubile tra l'anarchia replicativa e l'avidità energetica della cellula neoplastica (Strickland & Stoll, 2017). I fattori E2F liberi da legame inibitorio non si limitano a promuovere la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, ma guidano attivamente la sovraespressione di enzimi limitanti del ciclo glicolitico, tra cui l'esochinasi 2 (HK2) e la piruvato chinasi M2 (PKM2), legandosi direttamente alle regioni regolatrici dei loro promotori (Strickland & Stoll, 2017). Inoltre, il *pathway* di E2F modula l'espressione della piruvato deidrogenasi chinasi 4 (PDK4), la quale fosforila e inattiva il complesso della piruvato deidrogenasi (PDH) mitocondriale; questo blocco biochimico impedisce la conversione del piruvato in acetil-CoA, precludendone l'ingresso nel ciclo di Krebs e forzando la cellula di glioblastoma a convertire l'esoso in acido lattico all'interno del citoplasma, ottimizzando la disponibilità di intermedi carboniosi necessari per la sintesi *ex novo* di nucleotidi, lipidi e amminoacidi indispensabili per la rapida duplicazione della biomassa tumorale (Strickland & Stoll, 2017).

Pathway di NF- κ B e Wnt: infiammazione, staminalità e microambiente

L'attivazione persistente della via di segnalazione NF- κ B costituisce una caratteristica peculiare del GB, dove l'eterodimero p65-p50 sfugge al controllo della proteina inibitoria I κ B α e trasloca nel nucleo (Pouyan et al., 2025).

Questo circuito infiammatorio cronico è alimentato dal microambiente tumorale (TME) e sostiene l'invasività neoplastica e la chemioresistenza (Pouyan et al., 2025). In modo sinergico, la via Wnt si suddivide in: una via canonica β -catenina dipendente – essenziale per il mantenimento e l'autorinnovamento delle GSC – e in vie non canoniche, mediate da Wnt5a, associate al fenotipo migratorio e alla “firma invasiva” mesenchimale del tumore (Pouyan et al., 2025).

A livello metabolico, il fattore trascrizionale NF- κ B opera in stretta convergenza cooperativa con HIF-1 α , orchestrando un *network* biochimico che amplifica l'*upregulation* dei trasportatori GLUT e sposta l'equilibrio enzimatico a favore dell'Effetto Warburg (Strickland & Stoll, 2017). Sotto l'influsso degli stimoli infiammatori del microambiente, l'eterodimero attivo p65/p50 di NF- κ B trasloca nel nucleo dove si lega direttamente a uno specifico sito consensus localizzato sul promotore del gene di HIF-1 α , incrementandone la trascrizione basale anche in condizioni di normossia (Strickland & Stoll, 2017). Successivamente, NF- κ B e HIF-1 α agiscono in modo sinergico sul promotore del gene *SLC2A1* (codificante per GLUT1), potenziando esponenzialmente la densità di questo trasportatore sulla membrana plasmatica (Strickland & Stoll, 2017).

Parallelamente, questo asse trascrizionale promuove l'espressione della piruvato chinasi M2 (PKM2), un enzima che nel glioblastoma fluttua tra una conformazione tetramerică ad alta attività catalitica e una conformazione dimerica a bassa attività (Strickland & Stoll, 2017). La prevalenza della forma dimerica, indotta dalle modificazioni post-traduzionali guidate dal pathway infiammatorio, rallenta la conversione finale del fosfoenolpiruvato in piruvato, causando un accumulo a monte di intermedi glicolitici che vengono dirottati verso le vie biosintetiche laterali per sostenere la duplicazione cellulare (Strickland & Stoll, 2017). Inoltre, la forma dimerica di PKM2 è in grado di traslocare attivamente nel nucleo cellulare; qui, agendo come una vera e propria protein-chinasi, fosforila l'istone H3 in corrispondenza del residuo di treonina 11, un evento epigenetico che scalza i repressori cromatinici e favorisce il legame staccabile di HIF-1 α e NF- κ B sui rispettivi geni target, instaurando un loop di retroazione positiva che auto-alimenta il fenotipo glicolitico aberrante (Strickland & Stoll, 2017). Allo stesso tempo, l'attivazione aberrante della via Wnt/ β -catenina si integra in questo scenario agendo come il principale custode metabolico delle GSC (Strickland & Stoll, 2017). In assenza di segnale Wnt, la β -catenina citoplasmatica viene costantemente degradata da un complesso multiproteico di distruzione; l'interazione del ligando Wnt con il recettore Frizzled blocca tuttavia questo macchinario, permettendo alla β -catenina di accumularsi e traslocare nel nucleo (Strickland & Stoll, 2017). Una volta nel compartimento nucleare, la β -catenina si associa stabilmente con i fattori trascrizionali della famiglia TCF/LEF (*T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*), legandosi direttamente agli elementi di risposta Wnt situati nelle regioni regolatorie dei geni *SLC2A1* e *MYC* (Strickland & Stoll, 2017).

Questo legame stimola direttamente e selettivamente la trascrizione del trasportatore GLUT1 nelle nicchie staminali tumorali, garantendo loro l'elevato e costante apporto di glucosio necessario non solo a preservare lo stato di pluripotenza e *self-renewal*, ma anche a sovraesprimere le pompe di efflusso ABC e gli enzimi antiossidanti, meccanismi molecolari indispensabili per eludere lo stress citotossico indotto dalla chemioterapia standard e favorire le recidive tumorali (Strickland & Stoll, 2017). L'insieme di queste alterazioni dimostra che nel glioblastoma la disregolazione genetica si traduce, sistematicamente, in una dipendenza biochimica dal glucosio, offrendo un bersaglio metabolico ideale per l'applicazione di terapie adiuvanti e fitocomplessi *multitarget* (Gaiaschi et al., 2024).

Tuttavia, questa sottomissione dei pathway molecolari e dei circuiti oncogenici all'imperativo energetico della cellula neoplastica non potrebbe concretizzarsi senza un braccio operativo strutturale sulla membrana cellulare. Se gli assi intracellulari e i fattori trascrizionali costituiscono la mente direttiva dell'effetto Warburg, i trasportatori facilitati della famiglia dei GLUT rappresentano l'architettura fisica fondamentale attraverso cui questa dipendenza dal glucosio viene fisicamente attuata. Diventa, quindi, essenziale mappare la classificazione e la cinetica enzimatica di tali vettori transmembrana per comprendere i meccanismi di assorbimento del substrato nel *bulk* tumorale e nelle nicchie staminali.

1.4 L'Asse Ipossia/Pseudo-Ipossia e la Regolazione dei Trasportatori del Glucosio (GLUT1 e GLUT3)

La famiglia dei GLUT: classificazione biochimica dei trasportatori facilitati

Il sostentamento dell'elevato flusso glicolitico tipico dell'effetto Warburg necessita di un sistema di trasporto transmembrana altamente efficiente, capace di internalizzare il glucosio contro il gradiente intracellulare generato dalla sua rapida metabolizzazione. Tale funzione è assolta dalla famiglia dei trasportatori del glucosio a diffusione facilitata (GLUT), una classe di proteine integrali di membrana codificate dai geni della famiglia *SLC2A* (Adekola et al., 2018).

Da un punto di vista strutturale e biochimico, queste proteine appartengono alla *Major Facilitator Superfamily* (MFS) e sono caratterizzate da un'architettura altamente conservata costituita da 12 domini transmembrana a α -elica, con le estremità amminica e carbossilica localizzate nel compartimento citoplasmatico (Adekola et al., 2018). Sulla base dell'omologia di sequenza amminoacidica, della specificità di substrato e delle proprietà cinetiche, i membri della famiglia dei GLUT umani vengono suddivisi in tre macro-classi (Adekola et al., 2018).

La Classe I, che include le isoforme da GLUT1 a GLUT4, rappresenta la categoria funzionalmente più caratterizzata nel sistema nervoso centrale e nei contesti neoplastici, operando il trasferimento del D-glucosio secondo gradiente di concentrazione senza consumo diretto di ATP (Adekola et al., 2018).

Espressione e ruolo di GLUT1 per il sostegno al metabolismo basale del GB

Nel parenchima cerebrale sano, l'espressione di GLUT1 si articola in due forme dotate di un differente peso molecolare dovuto a diversi pattern di glicosilazione: la forma da 55 kDa è espressa costitutivamente a livello delle cellule endoteliali che compongono la barriera ematoencefalica (BEE) per mediare il transito trans-endoteliale del glucosio, mentre la forma da 45 kDa è localizzata prevalentemente sulla membrana plasmatica degli astrociti per supportare l'omeostasi metabolica gliale. Nel contesto del glioblastoma si assiste a una marcata e aberrante *up-regulation* di GLUT1, che risulta fortemente sovraespressa sulla membrana delle cellule tumorali che costituiscono il *bulk* neoplastico (Ruchika et al., 2025). Sotto il profilo dei segnali cellulari, in seguito a stimoli specifici, la proteina trasloca stabilmente sulla membrana plasmatica per permettere l'influsso continuo di esosi (Ruchika et al., 2025). Questa iper-espressione massiva conferisce alla massa tumorale un vantaggio cinetico immediato, garantendo un apporto continuo di glucosio essenziale per supportare la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, configurando GLUT1 come un marker fenotipico di alto grado istologico strettamente correlato a una prognosi infausta e all'aggressività del tumore (Ruchika et al., 2025).

La specificità cinetica di GLUT3: alta affinità e mantenimento delle cellule staminali del glioblastoma (GSC)

Mentre GLUT1 garantisce l'omeostasi energetica globale della massa tumorale, l'isoforma GLUT3 (SLC2A3) riveste un ruolo biologico marcatamente specializzato e asimmetrico all'interno dell'eterogeneità clonale del GB. In condizioni fisiologiche, GLUT3 è espresso quasi esclusivamente nei neuroni, dove le sue peculiari proprietà cinetiche assicurano l'approvvigionamento energetico anche in condizioni di severa ipoglicemia sistemica (Adekola et al., 2018). Sotto il profilo cinetico, infatti, GLUT3 presenta una costante di Michaelis-Menten (K_m) significativamente inferiore rispetto a quella di GLUT1; questo parametro biochimico si traduce in un'affinità per il glucosio ben cinque volte superiore, accoppiata a una velocità di trasporto massima ottimizzata (Flavahan et al., 2013). Nel glioblastoma, l'espressione di GLUT3 non è ubiquitaria, ma si concentra selettivamente nella nicchia delle GSC (Flavahan et al., 2013).

Questa compartimentazione strategica consente alle GSC di competere con successo con le cellule tumorali differenziate circostanti (*outcompete*) per l'assorbimento dell'esiguo glucosio disponibile (Flavahan et al., 2013). In questo modo, le staminali riescono a sopravvivere e a mantenere intatta la propria pluripotenza, la capacità di autorinnovamento (*self-renewal*) e il potenziale tumorigenico anche all'interno dei core tumorali ipossici e severamente privati di nutrienti (Flavahan et al., 2013). L'attivazione del trasporto ad alta affinità mediato da GLUT3 rappresenta, dunque, un meccanismo biochimico di cruciale importanza attraverso il quale la sottopopolazione staminale elude lo stress metabolico, tollera la restrizione nutrizionale e guida la chemioresistenza e la genesi delle recidive, collegandosi direttamente ai quadri di aggressività biologica descritti nel paragrafo 1.1 (Flavahan et al., 2013).

Il meccanismo trascrizionale: la stabilizzazione di HIF-1 α e il legame con gli elementi di risposta all'ipossia (HRE)

La cabina di regia molecolare che orchestra la sovraespressione coordinata di GLUT1 e GLUT3 risiede nell'asse ipossia/pseudo-ipossia, governato dal fattore di trascrizione eterodimerico HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) (Semenza, 2019). In condizioni di normossia, la subunità alfa (HIF-1 α) va incontro a una rapida degradazione proteasomiale: gli enzimi prolil-idrossilasi (PHD), utilizzando l'ossigeno molecolare come co-substrato, idrossilano due residui di prolina chiave di HIF-1 α , favorendone il riconoscimento da parte del complesso ubiquitina-ligasi di Von Hippel-Lindau (pVHL) (Semenza, 2019). All'interno del microambiente del GB, l'ipossia severa indotta dall'anarchia vascolare – o lo stato di “pseudo-ipossia” generato dall'attivazione costitutiva dell'asse RTK/PI3K/Akt/mTOR dettagliato nel paragrafo 1.3 – inattiva l'azione delle PHD (Semenza, 2019). Di conseguenza, HIF-1 si stabilizza, accumulandosi nel citoplasma per poi traslocare nel compartimento nucleare, dove si lega alla subunità costitutiva HIF-1 β (Semenza, 2019).

Il complesso eterodimerico funzionale recluta i co-attivatori trascrizionali p300/CBP e riconosce selettivamente le sequenze consensus note come Elementi di Risposta all'Ipssia (HRE, *Hypoxia Response Elements*), localizzate nelle regioni promotrici dei geni *SLC2A1* (GLUT1) e *SLC2A3* (GLUT3) (Ruchika et al., 2025). Questo legame innesca una potente transattivazione genica che accelera esponenzialmente la densità dei trasportatori di membrana, saldando indissolubilmente la deprivazione di ossigeno locale con l'iper-attivazione dei flussi glicolitici (Ruchika et al., 2025).

La decodificazione di questo sofisticato *network* trascrizionale e la mappatura cinetica dei trasportatori facilitati della membrana non rappresentano tuttavia soltanto un traguardo di biologia molecolare speculativa, ma aprono la strada all'identificazione di bersagli terapeutici di precisione.

Identificare la vulnerabilità energetica del glioblastoma e la sua dipendenza dai flussi transmembrana significa poter progettare strategie chimiche mirate a tagliare selettivamente i rifornimenti di esoso alla massa neoplastica.

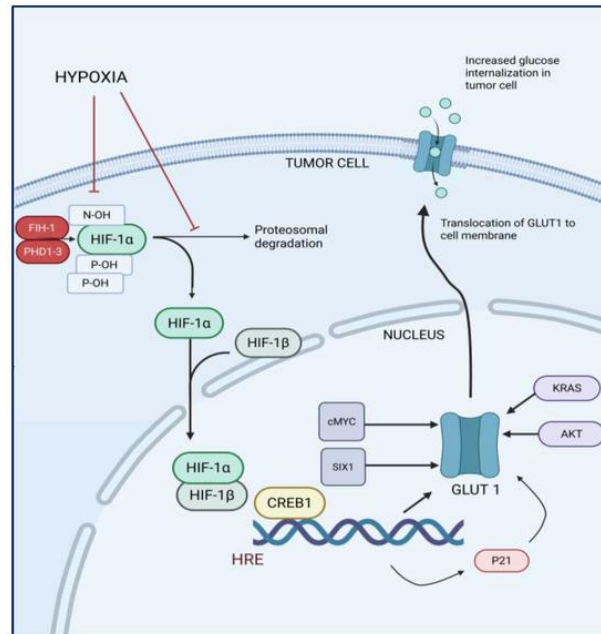


Figura 5: Meccanismo di stabilizzazione di HIF-1α indotto dall'ipossia e attivazione trascrizionale del gene SLC2A1 tramite il legame con gli elementi di risposta all'ipossia (HRE) nel nucleo cellulare (Adattato da Ruchika et al., 2025).

1.5 Target terapeutici e strategie di inibizione dei GLUT nel Glioblastoma

Inibitori sintetici preclinici: WZB117 e BAY-876 (cooperazione con immunoterapia anti-PD-1/PD-L1)

La dipendenza biochimica del glioblastoma dal trasporto facilitato del glucosio ha guidato lo sviluppo di inibitori sintetici di nuova generazione. Tra i composti preclinici maggiormente caratterizzati figura WZB117, una piccola molecola in grado di legarsi al sito catalitico di GLUT1, determinando un crollo intracellulare dei livelli di ATP, l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi mediata da stress energetico (Adekola et al., 2018). Al fine di ottenere una selettività d'azione superiore, la ricerca farmaceutica ha validato BAY-876, un inibitore altamente selettivo per l'isoforma GLUT1, in grado di compromettere efficacemente il metabolismo tumorale, ridurre la vitalità cellulare e migliorare la sopravvivenza *in vitro* e in modelli animali (Ruchika et al., 2025).

Recentemente, l'impiego di questi composti ha aperto prospettive innovative se integrato nei protocolli terapeutici combinati: il blocco dell'internalizzazione del glucosio, infatti, modifica drasticamente il microambiente tumorale (TME), riducendo la forte spinta glicolitica e la conseguente secrezione extracellulare di lattato (Ruchika et al., 2025).

Questo ripristino metabolico contrasta la formazione dell'ambiente acido intratumorale responsabile di facilitare l'evasione immunitaria, agendo in perfetta cooperazione sinergica con le immunoterapie basate sugli inibitori dei checkpoint immunitari (anti-PD-1/PD-L1) ed esaltando l'attività citotossica dei linfociti T infiltranti il tumore (TILs) (Ruchika et al., 2025).

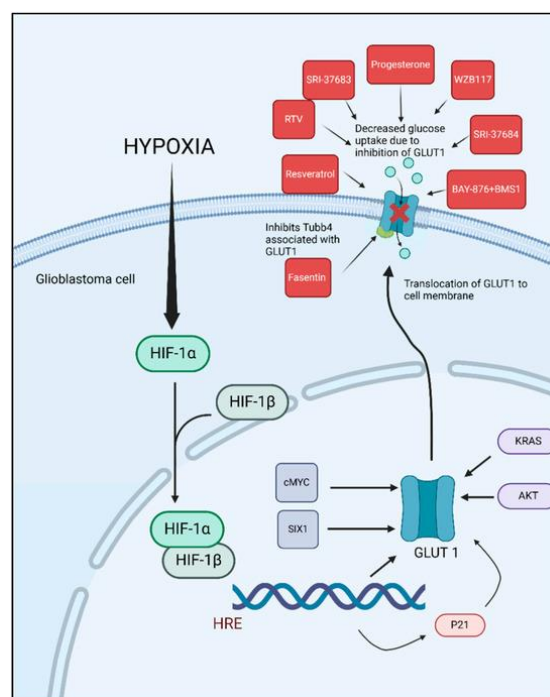


Figura 6: Mappa del cross-talk molecolare (EGFR/KRAS/AKT, c-Myc, p53) nella regolazione e traslocazione di GLUT1 e relativi target di inibizione farmacologica nel glioblastoma (Adattato da Ruchika et al., 2025).

Inibitori correlati ed endocrino-modulatori: Fasentin, composti SRI e Progesterone

Accanto alle molecole di derivazione prettamente sintetica, la strategia di targetizzazione metabolica include composti endocrino-modulatori e inibitori correlati a *pathway* recettoriali. Fasentin agisce bloccando direttamente il canale di transito di GLUT1, inibendo l'*uptake* glucidico e sensibilizzando le cellule di glioma ai danni genotossici dei trattamenti standard (Adekola et al., 2018). Parallelamente, i composti della serie SRI fungono da inibitori competitivi capaci di interferire con i

siti di legame esterni dei trasportatori facilitati (Adekola et al., 2018). In questo panorama, evidenze biochimiche hanno evidenziato un ruolo importante per gli ormoni steroidei, in particolare per il Progesterone.

Questo ormone è in grado di esercitare un'azione di endocrino-modulazione metabolica negativa nel GB, down-regolando l'espressione di GLUT1 e GLUT3 via trascrizionale e interferendo con l'attività di HIF-1 α offrendo così una base razionale per il riposizionamento di farmaci ormonali come adiuvanti metabolici in grado di limitare la spinta proliferativa indotta dai glucocorticoidi terapeutici (Atif et al., 2015).

Il ruolo del Resveratrolo: inibizione multi-pathway, superamento della chemioresistenza e radiosensibilizzazione

All'interno dell'approccio basato sulle strategie multi-target introdotte nel paragrafo 1.2, il polifenolo naturale Resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) si è imposto come uno dei composti bioattivi più promettenti (Liu et al., 2020). Il resveratrolo non si limita a competere fisicamente con il legame del glucosio sulla scanalatura idrofobica di GLUT1, ma esercita un'efficace inibizione *multi-pathway* (Liu et al., 2020). A livello molecolare, esso riduce l'accumulo di HIF-1 α e intercetta l'asse PI3K/Akt/mTOR, provocando una drastica *down-regulation* dell'espressione genica di GLUT1 e GLUT3, privando le cellule tumorali e le GSC della loro principale fonte di sostentamento (Atif et al., 2015). L'aspetto clinicamente più rilevante risiede nella sua capacità di operare il superamento della chemioresistenza alla TMZ e di promuovere la radiosensibilizzazione tissutale in modelli sperimentali (Liu et al., 2020). Il resveratrolo, infatti, induce l'attivazione di *pathway* soppressivi e l'inattivazione dell'enzima di riparazione MGMT – la cui iper-espressione epigenetica costituisce il principale ostacolo al Protocollo Stupp descritto nel paragrafo 1.2 – intercettando contemporaneamente i circuiti di sopravvivenza e di invasività infiammatoria governati dai fattori di trascrizione STAT3 e NF- κ B (Liu et al., 2020). Tuttavia, il passaggio dalla solida efficacia teorica riscontrata *in vitro* per questi inibitori – siano essi molecole biologiche o composti di sintesi – alla reale applicazione clinica sul paziente solleva interrogativi complessi. Sebbene la targetizzazione metabolica dei GLUT offra una prospettiva terapeutica rivoluzionaria, l'applicazione farmacologica deve fare i conti con ostacoli fisiologici protettivi quasi insormontabili, legati all'architettura molecolare e protettiva del sistema nervoso centrale.

Sfide cliniche e limitazioni: tossicità sistemica, eterogeneità intratumorale e barriera ematoencefalica (BEE)

Nonostante i robusti successi terapeutici riscontrati nei modelli sperimentali *in vitro*, la traslazione clinica dei protocolli basati sull'inibizione dei GLUT deve scontrarsi con severi limiti strutturali e biologici (Beylerli et al., 2022; De Maria et al., 2024). La principale sfida clinica è rappresentata dal rischio latente di tossicità sistemica neurobiologica ed ematologica: poiché GLUT1 è fondamentale per il transito trans-endoteliale della BEE e GLUT3 rappresenta il principale trasportatore del glucosio a livello neuronale, un'inibizione non selettiva di questi trasportatori potrebbe compromettere l'omeostasi energetica cerebrale, favorendo l'insorgenza di deficit neurologici e disfunzioni cognitive (Mueckler & Thorens, 2020; Simpson et al., 2008).

A questo scenario si somma l'ostacolo intrinseco della barriera ematoencefalica, che limita drasticamente il passaggio di numerose molecole antitumorali al parenchima cerebrale, riducendone la biodisponibilità intracerebrale a concentrazioni terapeuticamente efficaci (Arvanitis et al., 2020). Infine, la spiccata eterogeneità intratumorale e la plasticità metabolica del glioblastoma consentono alle cellule neoplastiche di sfuggire al blocco glicolitico mediante uno switch compensatorio verso vie metaboliche alternative, quali l'ossidazione degli acidi grassi, della glutammina o dell'acetato. Tali caratteristiche rendono necessario lo sviluppo di inibitori sempre più selettivi per il GBM, strategie terapeutiche combinatorie e sistemi di *drug delivery* in grado di migliorare la penetrazione cerebrale dei farmaci e ridurre gli effetti collaterali sistemici (Ruchika et al., 2025; De Maria et al., 2024).

2. SCOPO DEL LAVORO

Il glioblastoma (GB) rappresenta uno dei tumori maligni più aggressivi e refrattari del sistema nervoso centrale. Il fallimento dei protocolli terapeutici convenzionali – basati sul regime Stupp con l'alchilante TMZ – e l'inefficacia clinica di agenti citotossici ad ampio spettro come il cisplatino sono storicamente imputabili a tre grandi barriere biologiche: l'insorgenza di chemioresistenza intrinseca ed epigenetica (guidata dall'enzima MGMT), l'incapacità di superare efficientemente la BEE e la straordinaria plasticità di un metabolismo energetico aberrante, dominato dall'effetto Warburg.

In questo scenario preclinico, la moderna chimica bioinorganica ha aperto la strada alla progettazione di profarmaci del Platino nella forma di ossidazione (IV). Caratterizzati da una geometria ottaedrica e da un'elevata inerzia cinetica che riduce la tossicità sistemica, questi complessi sono ingegnerizzati per subire una riduzione intracellulare selettiva nel microambiente tumorale ipossico e riducente, liberando la specie attiva di Platino (II) e i rispettivi ligandi assiali bioattivi. Sulla base di tali premesse, il presente lavoro di tesi sperimentale si è posto l'obiettivo di investigare ed evidenziare i meccanismi di modulazione fine e di adattamento metabolico indotti sulle cellule di glioblastoma umano U251 da due complessi al Platino (IV) specificamente funzionalizzati:

- **(OC-6-44)-acetatodiamminedichlorido(2-(2-propynyl)octanoato)platino(IV)**, denominato **Pt(IV)Ac-POA**, progettato per combinare l'attività del cisplatino con quella di un inibitore delle istone deacetilasi (HDACi), favorendo il rilassamento della cromatina e modulando l'espressione di proteine coinvolte nella riparazione del DNA, tale ligando, inoltre, è in grado di aumentare la lipofilia del complesso, favorendone la diffusione attraverso le membrane biologiche;
- **Pt(acac)₂(DMS)**, un complesso basato sull'interazione del nucleo platinante con ligandi acetilacetoni e dimetilsolfossido, concepito per alterare le proprietà cinetiche di legame con le macromolecole e promuovere meccanismi citotossici non canonici, inclusa la disfunzione mitocondriale e l'attivazione di *pathway* pro-apoptotici, e per garantire una biodistribuzione ottimale.

A differenza dei classici screening citotossici focalizzati sulla determinazione della morte cellulare massiva a dosaggi elevati (IC₅₀), il focus centrale di questa ricerca è stato lo studio degli effetti biologici esercitati a concentrazioni subletali, corrispondenti alla dose IC₂₅ dei rispettivi composti, in un confronto diretto con la TMZ e il Cisplatino convenzionale.

L'impiego di una dose subletale risponde alla precisa necessità di analizzare le prime risposte fenotipiche e le strategie di sopravvivenza o di stress energetico messe in atto dalla cellula neoplastica prima dell'innescare irreversibile dei *pathway* apoptotici o necroptotici. Nello specifico, l'attività sperimentale si è articolata intorno a tre macro-obiettivi interconnessi:

- **Valutazione della modulazione dei trasportatori del glucosio:** Analizzare, tramite tecniche immunologiche e biomolecolari, l'impatto dei diversi trattamenti sull'espressione delle isoforme *Glucose transporter 1* (GLUT1), responsabile dell'apporto glicolitico basale, e *Glucose transporter 3* (GLUT3), trasportatore ad alta affinità cinetica sovra-espresso nelle cellule di glioblastoma.
- **Studio dell'attivazione dell'asse dello stress e dell'ipossia:** Investigare l'eventuale induzione di un fenotipo di pseudo-ipossia o di adattamento allo stress cellulare monitorando l'espressione del fattore trascrizionale HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*), elemento chiave che coordina l'espressione genica glicolitica.
- **Valutazione preliminare dell'assetto bioenergetico cellulare:** Investigare l'eventuale impatto dei diversi trattamenti sui livelli di espressione della subunità catalitica ATP5A (componente del Complesso V dell'ATP sintasi mitocondriale). L'obiettivo è verificare se l'esposizione alla dose subletale IC25 sia associata a una modulazione quantitativa o a una riorganizzazione morfologica del compartimento mitocondriale nelle cellule U251, delineando se i complessi innovativi indicano un profilo di risposta differente rispetto al cisplatino convenzionale e alla temozolomide.

I risultati ottenuti mirano a definire il profilo di efficacia dei complessi Pt(IV)Ac-POA e Pt(acac)₂(DMS), contribuendo a validare la strategia del design molecolare per scardinare la chemioresistenza del glioblastoma umano.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari e trattamenti farmacologici

La linea cellulare di glioblastoma umano U251 MG è stata coltivata in *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) supplementato con siero fetale bovino (FBS), L-glutammina, sodio piruvato, amminoacidi non essenziali (NEAA), penicillina e streptomicina. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Per gli esperimenti, le cellule sono state seminate a densità di 4×10^6 cellule per T75 flask per le analisi proteiche e 6×10^5 cellule su coverslip in piastre da 6 pozzetti per le analisi morfologiche. Dopo 48 ore, al raggiungimento di circa l'80% di confluenza, le cellule sono state trattate per ulteriori 48 ore in esposizione continua con cisplatino, Pt(IV)Ac-POA, Pt(acac)₂DMS e TMZ, utilizzati alla concentrazione corrispondente alla rispettiva IC₂₅, determinata da precedenti esperimenti di vitalità cellulare. La scelta della IC₂₅ è stata effettuata per valutare effetti biologici precoci e modulazioni molecolari in condizioni sub-citotossiche.

3.2 Analisi dell'espressione proteica mediante Western blot

L'espressione proteica è stata valutata mediante Western blot su lisati cellulari ottenuti al termine dei trattamenti. Le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo e lisate in tampone contenente Tris-HCl, MgCl₂, NP-40, DTT e β -glicerofosfato, supplementato con inibitori delle proteasi e delle fosfatasi. La lisi è stata condotta su ghiaccio per preservare l'integrità proteica. La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio Bradford (Sigma-Aldrich) e utilizzata per normalizzare il carico dei campioni. Per ogni condizione sperimentale sono stati caricati 30 μ g di proteine totali su gel SDS-PAGE al 10%, scelto in base al peso molecolare delle proteine di interesse. Dopo separazione elettroforetica, le proteine sono state trasferite su membrane di PVDF mediante sistema semi-dry Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). L'efficienza del trasferimento è stata verificata mediante colorazione reversibile con Rosso Ponceau S. Le membrane sono state, quindi, incubate in soluzione bloccante (PBS-Tween 0,2% contenente 5% latte scremato) per ridurre il legame aspecifico, e successivamente incubate overnight a 4 °C con anticorpi primari specifici:

- Trasportatore del Glucosio 1 (GLUT1), ABE2438, Rb, *Immunological sciences*;
- Trasportatore del Glucosio 3 (GLUT3), ABE7215, Rb, *Immunological sciences*;
- Subunità alfa della subunità F1 dell'ATP sintasi mitocondriale (ATP5A1), 14676-1-AP, Rb, Proteintech;
- Fattore 1-alfa inducibile dall'ipossia (Hif1 Alpha), Sc53546, Ms, Santa Cruz Biotechnology.

Dopo lavaggi in PBS-Tween, le membrane sono state incubate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi (HRP, 1:2000). La rivelazione è stata effettuata mediante sistema di chemiluminescenza (ECL, Cyanagen) e acquisita tramite imaging system Azure 600. Quando necessario, le membrane sono state sottoposte a procedura di stripping per la rimozione degli anticorpi e la successiva re-incubazione. L'analisi densitometrica delle bande è stata eseguita mediante software *ImageJ*. I valori sono stati normalizzati rispetto alla β -actina (GTX109639, Rb, GeneTex) e utilizzati per l'analisi quantitativa dei livelli proteici.

3.3 Analisi in immunofluorescenza indiretta

L'immunofluorescenza indiretta è stata utilizzata esclusivamente a scopo qualitativo e morfologico, per valutare la distribuzione subcellulare delle proteine di interesse e le modificazioni fenotipiche indotte dai trattamenti farmacologici. Le cellule sono state seminate su *coverslip* sterili e trattate come descritto sopra. Al termine dei trattamenti, i campioni sono stati fissati con paraformaldeide al 4% o etanolo freddo al 70%, in funzione dell'antigene analizzato. Successivamente, le cellule sono state incubate con anticorpi primari specifici e rivelate mediante anticorpi secondari coniugati con fluorofori 488 o 594 (GeneTex). I nuclei sono stati controcolorati con Hoechst 33258. I coprioggetti sono stati montati con mezzo di montaggio Mowiol. Le immagini sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Olympus BX51 equipaggiato con sistema di acquisizione digitale Olympus Cell F. L'acquisizione è stata effettuata mantenendo costanti i parametri di esposizione tra i diversi campioni. Per ogni condizione sperimentale sono stati acquisiti campi rappresentativi selezionati in modo non quantitativo, al fine di documentare le differenze morfologiche e di localizzazione subcellulare delle proteine. Le immagini ottenute sono state utilizzate esclusivamente come supporto descrittivo e qualitativo ai dati quantitativi ottenuti mediante Western blot.

3.4 Analisi statistica

Tutti i dati quantitativi derivanti dall'analisi densitometrica delle bande Western blot sono stati espressi come media $\pm$ errore standard della media (SEM) di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante software GraphPad Prism 5.01. Le differenze tra gruppi sperimentali sono state valutate mediante analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) seguita dal test post hoc di Tukey per confronti multipli. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo

4. RISULTATI

4.1 Valutazione dell'espressione e della localizzazione dei trasportatori facilitati del glucosio: GLUT1 e GLUT3

Al fine di caratterizzare l'impatto dei diversi trattamenti farmacologici sull'assetto glicolitico delle cellule di glioblastoma umano U251, si è analizzata l'espressione proteica globale e la compartimentazione sub-cellulare delle due principali isoforme recettoriali della Classe I deputate all'importazione del glucosio: GLUT1 e GLUT3. L'indagine molecolare è stata condotta accoppiando la quantificazione densitometrica tramite Western blot all'analisi immunocitofluorimetrica in microscopia a fluorescenza, sfruttando una tripla marcatura immunologica allo scopo di mapparne il traffico vescicolare endogeno.

Gruppo Sperimentale	GLUT1 (%) ± SD)	GLUT3 (%) ± SD)	Significatività Statistica(p-value)
CTR	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	Basale di riferimento
Cisplatino	85,51 ± 27,86	50,30 ± 10,41	*** $p = 0,0005$ vs CTR (per GLUT3)
Pt(IV)Ac-POA	148,78 ± 41,34	77,34 ± 11,55	* $p = 0,0315$ vs Cisplatino (per GLUT3)
Pt(acac) ₂ (DMS)	88,57 ± 39,77	58,75 ± 5,47	** $p = 0,0020$ vs CTR (per GLUT3)
TMZ	105,29 ± 47,40	80,02 ± 12,41	ns per GLUT1; * $p = 0,0182$ vs Cisplatino (per GLUT3)

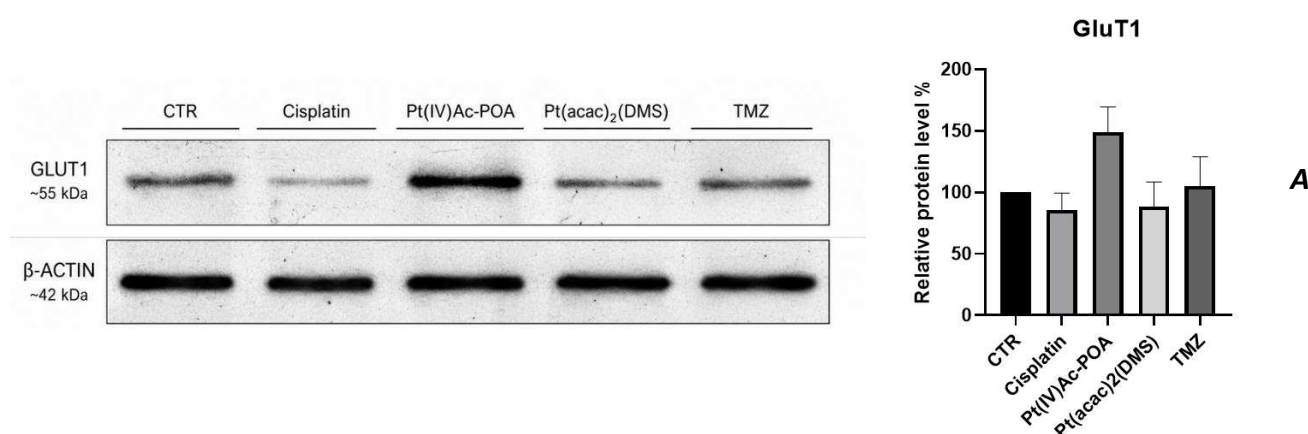
Tabella 1: Profilo di espressione proteica dei trasportatori del glucosio GLUT1 e GLUT3 in cellule U251 dopo 24h di trattamento. I valori sono espressi come percentuale (%) ± SD rispetto al controllo non trattato (normalizzato al 100%). La significatività statistica è stata calcolata tramite ANOVA a una via seguita da test post-hoc di Tukey.

Analisi quantitativa e compartimentazione morfologica di GLUT1

Il trasportatore GLUT1 (*Glucose Transporter 1*) costituisce il principale vettore transmembrana responsabile del sostentamento metabolico basale e del mantenimento dell'elevato flusso glicolitico nel bulk del glioblastoma. L'analisi densitometrica delle bande ottenute mediante Western blot (~55 kDa), normalizzate sulla proteina di controllo β -actina (~42 kDa), non ha evidenziato variazioni statisticamente significative tra i diversi gruppi sperimentali sottoposti a concentrazioni subletali (IC25) dei composti (ANOVA con test post-hoc di Tukey; tutti i confronti $p > 0,05$). Fissata l'espressione basale del gruppo di controllo (CTR) al 100,0%, l'esposizione al Cisplatino ha determinato una lieve contrazione dei livelli proteici globali, evidenziando un valore dell' $85,5 \pm 13,9\%$ (corrispondente a una riduzione del 14,5% rispetto al CTR).

Profili differenti sono stati osservati in seguito all'esposizione a TMZ e Pt(acac)₂(DMS).

In entrambi i casi, i livelli di espressione di GLUT1 sono rimasti vicini alla linea basale del controllo, senza variazioni statisticamente significative: le cellule trattate con TMZ hanno mostrato un valore pari al $105,3 \pm 23,7\%$, mentre quelle esposte al complesso innovativo Pt(acac)₂(DMS) hanno registrato un valore dell' $88,6 \pm 19,9\%$. Al contrario, il trattamento con il profarmaco lipofilo Pt(IV)Ac-POA ha indotto una marcata tendenza all'*up-regulation*, facendo registrare il valore medio più elevato dell'intero set sperimentale, pari a $148,8 \pm 20,7\%$ (+48,8% rispetto alle cellule non trattate). Tuttavia, a causa dell'elevata variabilità biologica inter-campione, tale incremento non ha raggiunto la significatività statistica nei confronti del controllo o degli altri bracci farmacologici.



DAPI GLUT1 Golgi

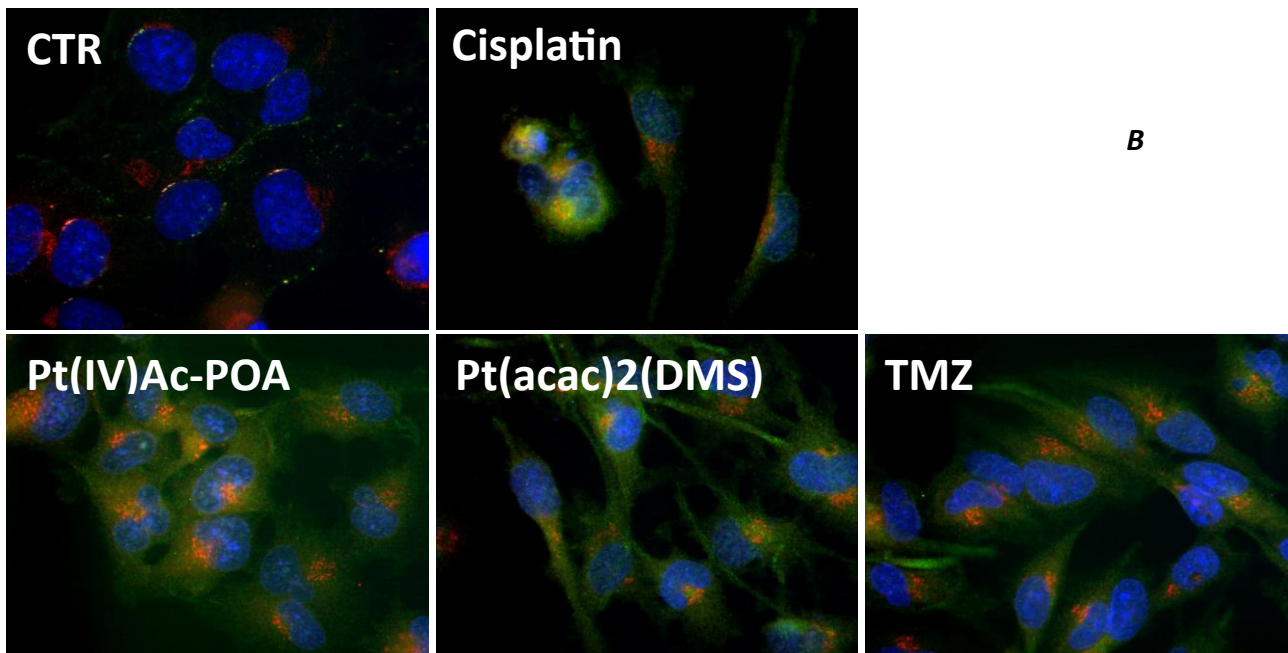


Figura 7. Valutazione dell'espressione proteica e della localizzazione sub-cellulare di GLUT1 in cellule U251. Le cellule sono state sottoposte a trattamento per 48 ore con Cisplatino, Pt(IV)Ac-POA, Pt(acac)₂(DMS) e TMZ a concentrazioni subletali pari alla rispettiva IC₂₅. **(A)** Analisi Western blot rappresentativa dei livelli proteici di GLUT1 (~55 kDa) con relativo grafico delle quantificazioni densitometriche; la β -actina (~42 kDa) è stata impiegata come controllo di caricamento cellulare. I dati quantitativi del grafico rappresentano la media $\pm$ SEM di 4 replicati biologici indipendenti, espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato (normalizzato al 100%). L'analisi statistica (ANOVA con test post-hoc di Tukey) indica l'assenza di differenze statisticamente significative (*ns*, $p > 0,05$). **(B)** Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 60 $\times$). I nuclei sono colorati in blu (DAPI), GLUT1 è marcato in verde (GTX anti rabbit 488) e l'apparato di Golgi è evidenziato in rosso (Alexa Fluor anti human 594).

L'indagine morfologica condotta in immunofluorescenza ha permesso di contestualizzare i dati molecolari, rivelando la fine distribuzione della proteina:

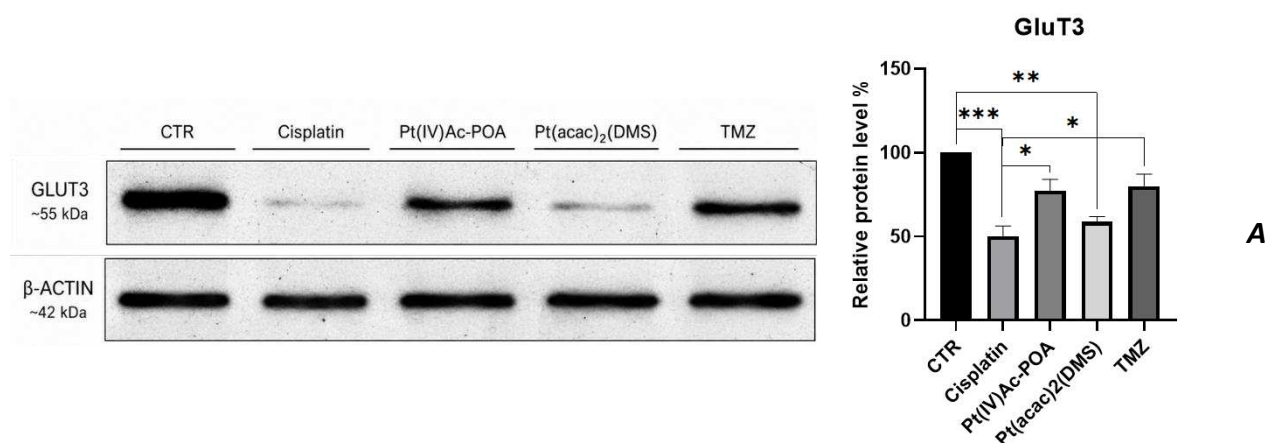
- **Controllo (CTR):** Il segnale associato a GLUT1 si presenta marcatamente localizzato in corrispondenza della membrana plasmatica, definendo nettamente il profilo perimetrale cellulare, mentre il compartimento citoplasmatico interno risulta privo di fluorescenza specifica.
- **Trattamenti chemioterapici:** Le cellule manifestano alterazioni morfologiche distinte a seconda del composto somministrato. Nello specifico, in seguito all'esposizione a Cisplatino e Pt(acac)₂(DMS) si osserva un marcato allungamento dei prolungamenti citoplasmatici; al contrario, le cellule esposte a Pt(IV)Ac-POA e Temozolomide mostrano una contrazione del corpo cellulare, alterazioni strutturali che indicano chiaramente uno stato di sofferenza e stress cellulare.

In tutti i campioni trattati, inoltre, si riscontra una perdita della netta localizzazione perimetrale di GLUT1 osservata nel controllo: il segnale associato al trasportatore appare distribuito diffusamente all'interno del compartimento citoplasmatico e risulta significativamente meno concentrato in corrispondenza della membrana plasmatica, evidenziando una potenziale alterazione nei meccanismi di traslocazione e posizionamento superficiale della proteina.

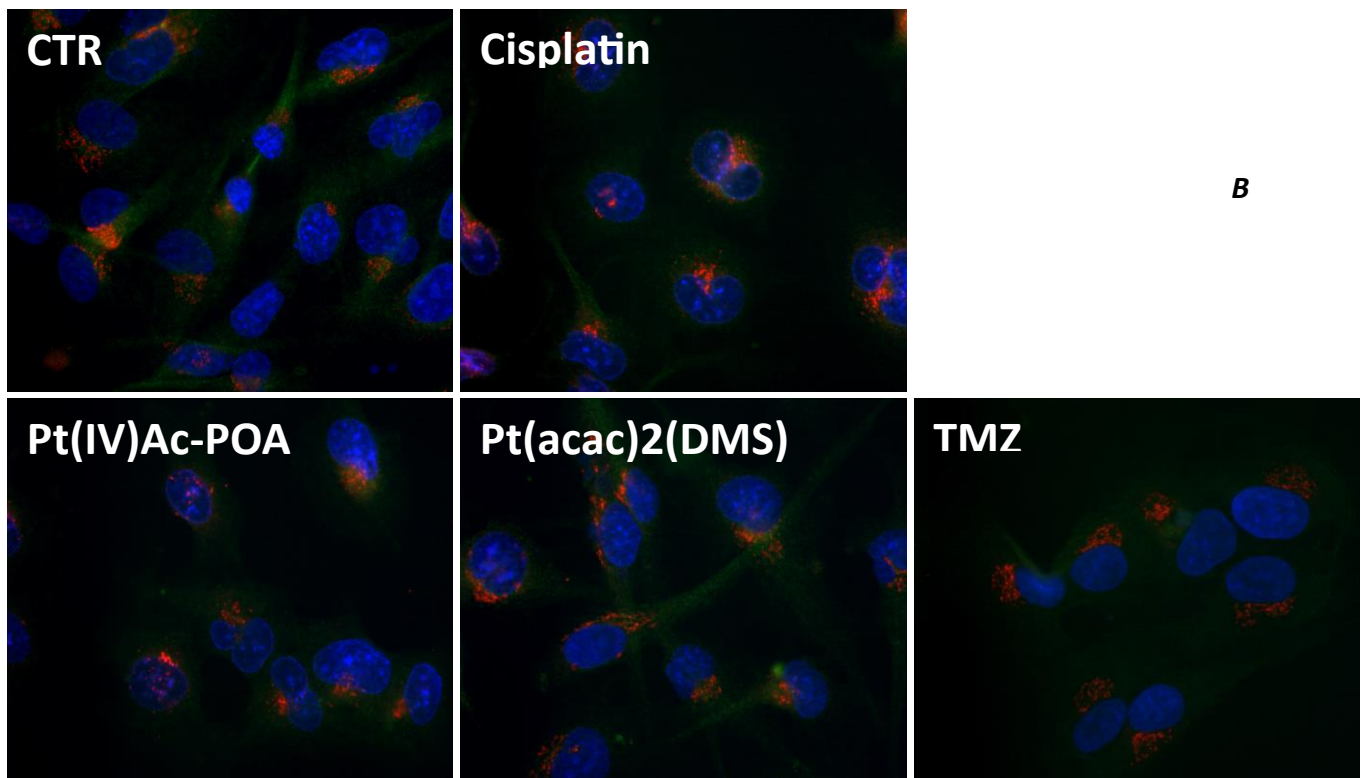
Analisi quantitativa e compartimentazione morfologica di GLUT3

L'isoforma GLUT3 rappresenta il trasportatore di glucosio a più alta affinità cinetica espresso nel sistema nervoso centrale, risultando un *marker* critico associato alla chemioresistenza e al mantenimento della staminalità (GSC) nei core ipossici del glioblastoma. A differenza di GLUT1, la quantificazione dei livelli proteici di GLUT3 tramite Western blot ha evidenziato alterazioni marcatamente significative e farmaco-dipendenti tra i gruppi esaminati.

Fissato il controllo basale al 100,0%, il trattamento con Cisplatino ha indotto un severo abbattimento dei livelli di GLUT3, crollati al $50,3 \pm 6,0\%$, registrando una contrazione del 49,7% rispetto al basale con un'elevata significatività statistica ($*** p = 0,0005$ vs CTR). In modo estremamente interessante, il complesso innovativo **Pt(acac)₂(DMS)** ha dimostrato un'efficacia sovrapponibile al farmaco di riferimento tradizionale, riducendo significativamente l'espressione del trasportatore al $58,8 \pm 3,2\%$ ($p = 0,0020$ vs CTR). Al contrario, riduzioni marcatamente più contenute e prive di significatività statistica sono state indotte sia dal profarmaco lipofilo Pt(IV)Ac-POA ($77,3 \pm 6,7\%$; $p = 0,0775$) sia dalla TMZ ($80,0 \pm 7,2\%$; $p = 0,1330$). Il test post-hoc per i confronti multipli ha inoltre evidenziato che le cellule esposte a Pt(IV)Ac-POA preservano livelli di GLUT3 significativamente superiori rispetto a quelle trattate con Cisplatino ($* p = 0,0315$), mentre non sono emerse differenze rilevanti nei confronti di TMZ o Pt(acac)₂(DMS).



DAPI GLUT3 Golgi



B

Figura 8. Valutazione dell'espressione proteica e della localizzazione sub-cellulare di GLUT3 in cellule U251. Le cellule sono state sottoposte a trattamento per 48 ore con Cisplatino, Pt(IV)Ac-POA, Pt(acac)₂(DMS) e TMZ a concentrazioni subletali pari alla rispettiva IC₂₅. **(A)** Analisi Western blot rappresentativa dei livelli proteici di GLUT3 (~45 kDa) con relativo grafico delle quantificazioni densitometriche; la β -actina (~42 kDa) è stata impiegata come controllo di caricamento cellulare. I dati quantitativi del grafico rappresentano la media $\pm$ SEM di 3 replicati biologici indipendenti, espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato (normalizzato al 100%). L'analisi statistica (ANOVA con test post-hoc di Tukey) indica differenze altamente significative rispetto al controllo (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) e variazioni significative tra i bracci di trattamento (* $p < 0,05$). **(B)** Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 60 $\times$). I nuclei sono colorati in blu (DAPI), GLUT3 è marcato in verde e le strutture intracellulari/endomembrane sono evidenziate in rosso.

L'analisi visiva dei pannelli di immunofluorescenza ha confermato ed esteso i riscontri molecolari:

- **Controllo (CTR), Cisplatino e Pt(acac)₂(DMS):** I campioni mostrano un network cellulare coeso, caratterizzato da una fluorescenza distribuita in clusters granulari citoplasmatici e in sede perinucleare. Tale localizzazione del segnale risulta concentrata **nelle strutture vescicolari interne**, verosimilmente a livello del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi, zone deputate alla sintesi e allo stoccaggio intracellulare del trasportatore.
- **Pt(IV)Ac-POA e Temozolomide (TMZ):** In seguito a questi trattamenti, il profilo di espressione visiva di GLUT3 perde la sua caratteristica organizzazione in clusters perinucleari. Il segnale specifico si distribuisce in modo omogeneo e diffuso, occupando estesamente l'intero compartimento citosolico.

4.2 Caratterizzazione del bilancio bioenergetico mitocondriale e della risposta allo stress epigenetico: ATP5A e HIF-1 α

Al fine di determinare se l'esposizione a dosi subletali dei diversi agenti platinanti e alchilanti induca una disfunzione della catena respiratoria mitocondriale o se provochi l'attivazione di *pathway* compensatori di sopravvivenza, l'indagine è stata estesa alla quantificazione di due marcatori omeostatici chiave: **ATP5A** (subunità catalitica essenziale del complesso V dell'ATP sintasi mitocondriale, indicatore della capacità di fosforilazione ossidativa) e **HIF-1 α** (Coordinatore della risposta allo stress metabolico e ipossico).

Gruppo Sperimentale	ATP5A (% $\pm$ SD)	HIF-1 α (% $\pm$ SD)	Significatività Statistica (p-value)
CTR	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	Basale di riferimento
Cisplatino	157,17 $\pm$ 59,33	80,70 $\pm$ 11,91	** $p = 0,0022$ vs Pt(IV)Ac-POA; ** $p = 0,0049$ vs TMZ
Pt(IV)Ac-POA	150,98 $\pm$ 51,25	123,87 $\pm$ 16,70	* $p = 0,0302$ vs Pt(acac) ₂ (DMS) (per HIF-1 α)
Pt(acac) ₂ (DMS)	111,43 $\pm$ 39,66	93,13 $\pm$ 16,93	ns per ATP5A
TMZ	160,56 $\pm$ 86,01	120,01 $\pm$ 11,46	ns vs Pt(IV)Ac-POA ($p = 0,9927$)

Tabella 2. Profilo di espressione proteica di ATP5A e stabilità di HIF-1 α in cellule U251 dopo 24h di trattamento. I valori sono espressi come percentuale (%) $\pm$ SD rispetto al controllo non trattato in normossia (normalizzato al 100%). La significatività statistica è stata calcolata tramite ANOVA a una via seguita da test post-hoc di Tukey.

Analisi quantitativa e compartimentazione morfologica di ATP5A

L'analisi dell'espressione proteica globale di ATP5A tramite Western blot (~55 kDa) non ha fatto registrare variazioni statisticamente significative tra i cinque gruppi in esame (ANOVA con test di

Tukey; tutti i confronti $p > 0,05$). Sotto il profilo biochimico, tuttavia, emerge una tendenza uniforme e generalizzata verso un incremento dei livelli del marcatore in tutti i campioni trattati rispetto al controllo basale (100,0%). Nel dettaglio, il trattamento con il Cisplatino tradizionale ha indotto un aumento medio pari a $157,2 \pm 29,7\%$ (+57,2% rispetto al CTR), un valore estremamente vicino a quello riscontrato per il derivato lipofilo Pt(IV)Ac-POA ($151,0 \pm 25,6\%$). La Temozolomide ha mostrato l'*up-regulation* media più marcata, raggiungendo il $160,6 \pm 43,0\%$ (+60,6%), mentre il complesso innovativo **Pt(acac)₂(DMS)** ha fatto registrare l'incremento più contenuto, attestandosi a $111,4 \pm 19,8\%$ (+11,4% rispetto al CTR).

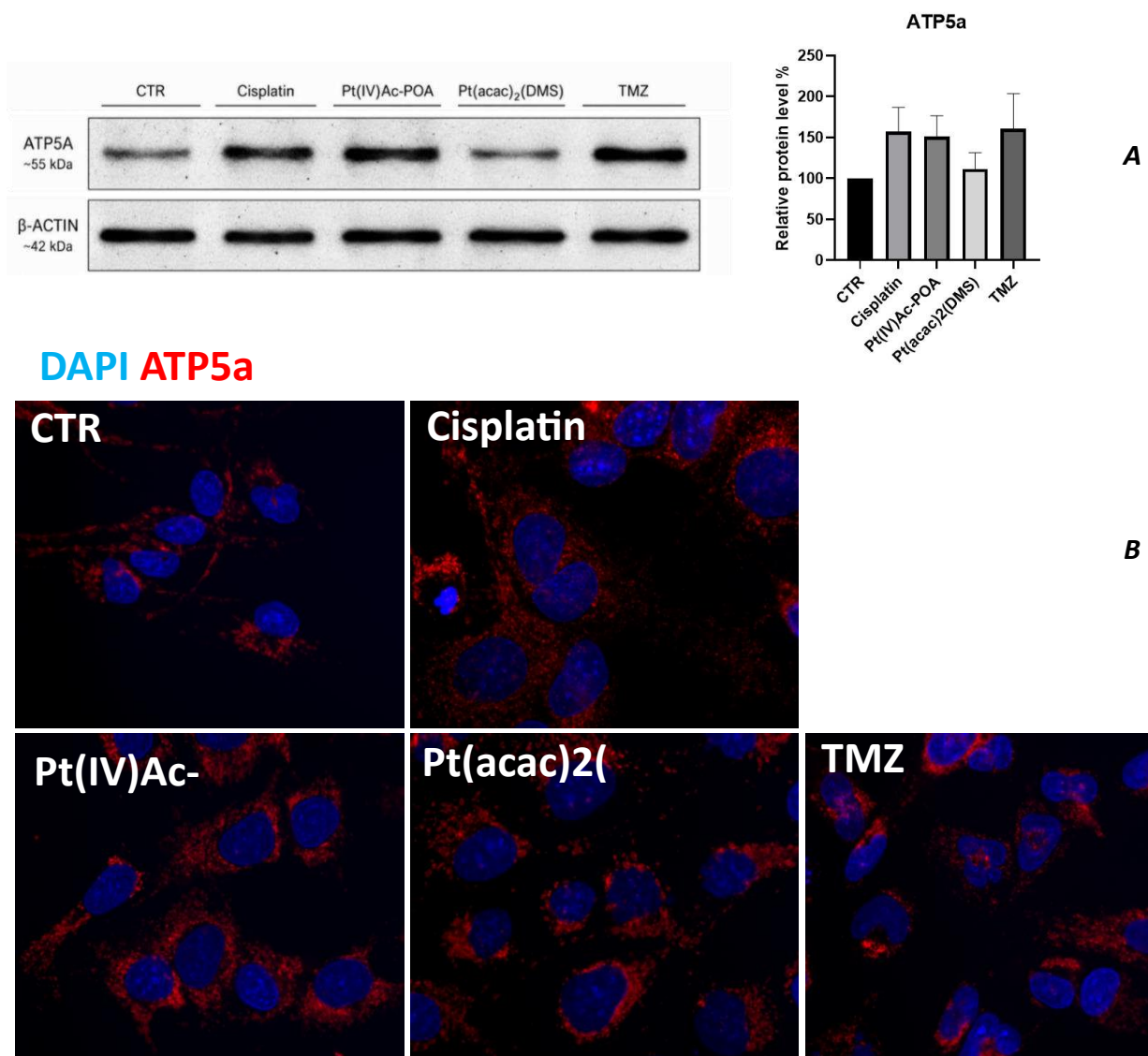


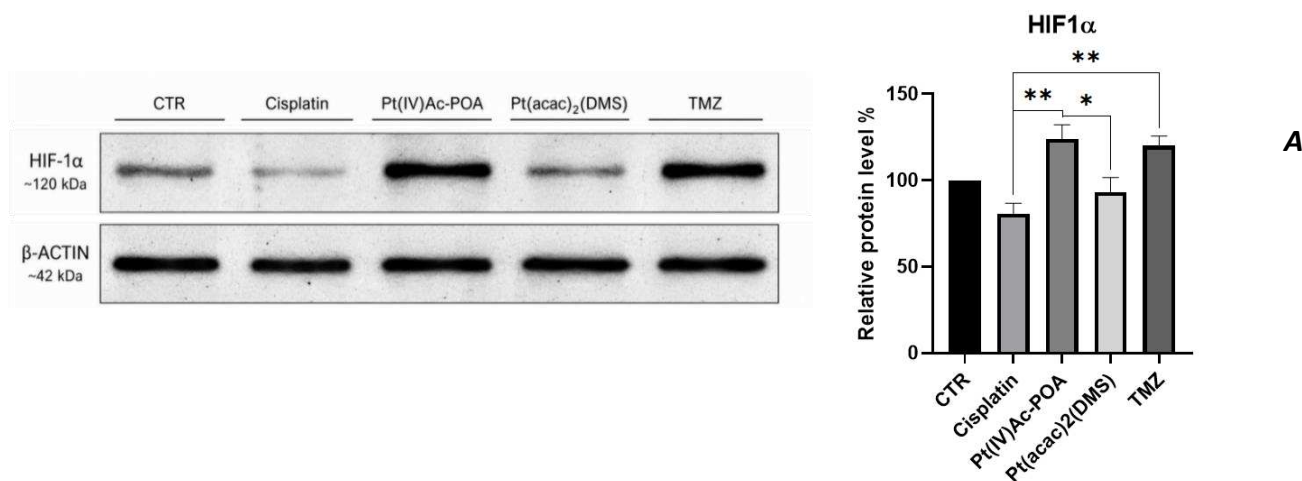
Figura 9. Valutazione dell'espressione proteica e della localizzazione sub-cellulare di ATP5a in cellule U251. Le cellule sono state sottoposte a trattamento per 48 ore con Cisplatino, Pt(IV)Ac-POA, Pt(acac)₂(DMS) e TMZ a concentrazioni subletali pari alla rispettiva IC₂₅. **(A)** Analisi Western blot rappresentativa dei livelli proteici di ATP5a (~55 kDa) con relativo grafico delle quantificazioni densitometriche; la β -actina (~42 kDa) è stata impiegata come controllo di caricamento cellulare. I dati quantitativi del grafico rappresentano la media $\pm$ SEM di 4 replicati biologici indipendenti, espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato (normalizzato al 100%). L'analisi statistica (ANOVA con test post-hoc di Tukey) indica l'assenza di differenze statisticamente significative (ns, $p > 0,05$) tra i gruppi sperimentali. **(B)** Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 60 $\times$). I nuclei sono colorati in blu (DAPI), la subunità ATP5a è marcata in rosso.

Lo studio microscopico condotto in immunofluorescenza (canale rosso per ATP5A) ha permesso di valutare la distribuzione del segnale:

- **Controllo (CTR):** il segnale si distribuisce uniformemente nel citosol, delineando un *network* reticolare interconnesso, filiforme e ben ramificato attorno alla periferia nucleare.
- **Cisplatino, Pt(IV)Ac-POA e Temozolomide (TMZ):** in seguito a questi trattamenti, il segnale associato alla subunità ATP5A perde la sua continuità e assume una morfologia marcatamente puntiforme, un reperto microstrutturale indicativo di estesi processi di fissione o collasso mitocondriale strettamente correlati all'innescio dei pathways di morte cellulare programmata.
- **Pt(acac)₂(DMS):** il profilo di marcatura indotto dal complesso innovativo presenta caratteristiche sovrapponibili a quelle descritte per gli altri chemioterapici, sebbene il fenotipo puntiforme risulti meno esasperato. Il segnale si attesta su un livello intermedio tra la rete mitocondriale integrata del controllo e il quadro di frammentazione indotto dai trattamenti precedenti.

Analisi quantitativa e compartimentazione morfologica di HIF-1 α

Lo studio del fattore trascrizionale **HIF-1 α** (~120 kDa) ha rivelato risposte biologiche divergenti e farmaco-dipendenti. Fissata l'espressione basale del controllo in normossia al 100,0%, l'esposizione al Cisplatino ha determinato una contrazione dei livelli proteici fino all' $80,7 \pm 6,0\%$ (-19,3%), seguito da un andamento debolmente riduttivo per il complesso Pt(acac)₂(DMS) ($93,1 \pm 8,5\%$). Al contrario, sia il profarmaco al Platino(IV) **Pt(IV)Ac-POA** sia la TMZ hanno indotto una potente e robusta stabilizzazione della proteina in perfette condizioni di normossia atmosferica, spingendone i livelli medi rispettivamente al $123,9 \pm 8,4\%$ (+23,9% vs CTR) e al $120,0 \pm 5,7\%$ (+20,0%). L'analisi statistica post-hoc ha confermato l'elevata significatività del picco di stabilizzazione indotto da Pt(IV)Ac-POA rispetto al Cisplatino ($p = 0,0022$; segnale superiore del 53,5%) e nei confronti del derivato innovativo Pt(acac)₂(DMS) (* $p = 0,0302$). Una differenza altrettanto significativa è emersa nel confronto diretto tra TMZ e Cisplatino ($p = 0,0049$), mentre i profili di Pt(IV)Ac-POA e TMZ sono risultati statisticamente indistinguibili ($p = 0,9927$).



DAPI HIF1α

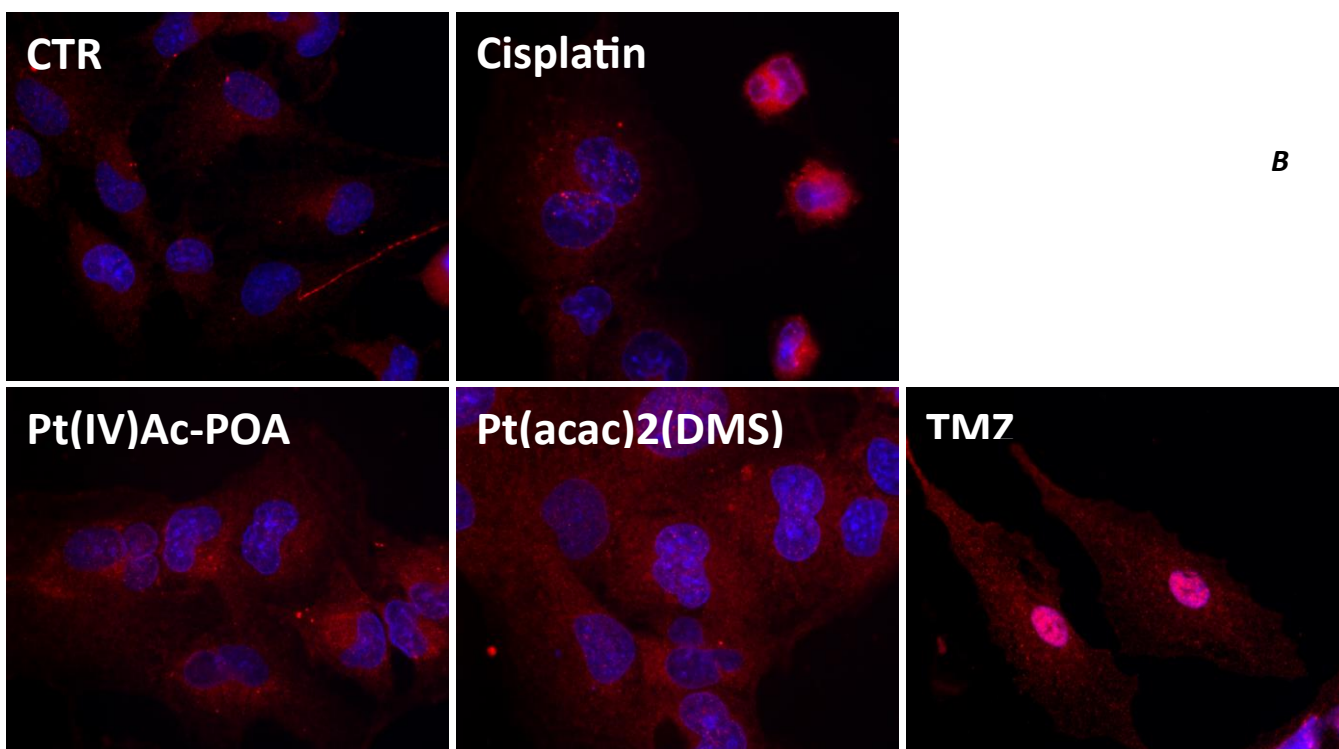


Figura 10. Valutazione dell'espressione proteica e della localizzazione sub-cellulare di HIF-1α in cellule U251. Le cellule sono state sottoposte a trattamento per 48 ore con Cisplatino, Pt(IV)Ac-POA, Pt(acac)₂(DMS) e TMZ a concentrazioni subletali pari alla rispettiva IC25. **(A)** Analisi Western blot rappresentativa dei livelli proteici di HIF-1α (~120 kDa) con relativo grafico delle quantificazioni densitometriche; la β-actina (~42 kDa) è stata impiegata come controllo di caricamento cellulare. I dati quantitativi del grafico rappresentano la media ± SEM di 4 replicati biologici indipendenti, espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato (normalizzato al 100%). L'analisi statistica (ANOVA con test post-hoc di Tukey) indica l'assenza di differenze significative nei confronti diretti con il controllo, ma evidenzia variazioni statisticamente significative nei confronti tra i diversi bracci di trattamento (*p < 0,05; **p < 0,01). **(B)** Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (ingrandimento 60×). I nuclei sono colorati in blu (DAPI), HIF-1α è marcato in rosso.

L'indagine in immunofluorescenza ha restituito un quadro visivo interessante, portando all'attenzione possibili differenze nella dinamica di traslocazione del fattore:

- **Controllo (CTR) e Cisplatino:** Mostrano una fluorescenza rossa diffusa, di debole intensità e confinata prevalentemente nel compartimento citosolico, riflettendo il rapido turn-over e la degradazione proteasomiale a cui la proteina va incontro in normossia.
- Il trattamento con **Pt(IV)Ac-POA**, **Pt(acac)₂(DMS)** o **TMZ** vede un progressivo accumulo di segnale nucleare. Questa sovrapposizione cromatica documenta visivamente che il fattore è presente nel compartimento nucleare dove è noto esercitare la propria attività trascrizionale, suggerendo l'innescò di una vigorosa risposta allo stress cellulare indotto da questi trattamenti.

5. DISCUSSIONE

Il glioblastoma si distingue nel panorama oncologico per una marcata eterogeneità biologica e un'elevata plasticità metabolica, caratteristiche che consentono alle cellule tumorali di rimodellare dinamicamente i propri pathway energetici per sopravvivere agli stimoli farmacologici e alle fluttuazioni del microambiente. In questo contesto, i meccanismi adattativi cellulari non si muovono lungo binari rigidamente predeterminati, ma sfruttano la coesistenza flessibile di glicolisi e fosforilazione ossidativa per aggirare i blocchi metabolici indotti dalle terapie (De Maria et al., 2024). Nel presente lavoro, l'analisi dell'espressione e della localizzazione di GLUT1, GLUT3, ATP5A e HIF-1 α ha permesso di mappare questa complessa rete di rimodellamento nelle cellule U251 in seguito all'esposizione a Cisplatino, ai complessi innovativi al Platino (Pt(IV)Ac-POA e Pt(acac)₂(DMS)) e a TMZ. A differenza di precedenti evidenze condotte a concentrazioni citotossiche massicce (IC_{50}), nelle quali l'insulto chimico determinava un severo stress ossidativo con conseguente abbattimento dei marker mitocondriali e innesco dei processi di morte cellulare (Gaiaschi et al., 2026), l'impiego mirato di dosi subletali (IC_{25}) ha consentito di spostare il focus sperimentale. Questa specifica finestra di trattamento ha permesso di isolare e analizzare non gli effetti citotossici diretti e distruttivi, bensì i meccanismi fini di compensazione metabolica e le risposte plastiche attivate attivamente dalla quota di popolazione cellulare sopravvissuta all'insulto farmacologico. È stato infatti ampiamente documentato che le cellule che riescono a superare una condizione di stress terapeutico iniziale attuano una rapida e coordinata riprogrammazione del metabolismo del glucosio, sfruttando lo *shift* nell'utilizzo dei substrati energetici per facilitare l'accumulo di biomassa, eludere l'azione dei trattamenti convenzionali e porre le basi per la chemioresistenza (Rong et al., 2024). L'indagine a dose IC_{25} offre quindi una fotografia cruciale delle prime fasi di questo adattamento difensivo.

L'approvvigionamento continuo di esosi rappresenta un prerequisito energetico e biosintetico imprescindibile per il sostentamento e la proliferazione delle cellule di glioblastoma (Rong et al., 2024). All'interno della famiglia dei trasportatori SLC2, deputati alla diffusione facilitata del glucosio attraverso le membrane biologiche, GLUT1 si configura come l'isoforma basale ubiquitaria, caratterizzata da un'elevata affinità di legame per il substrato (Mueckler et al., 2013). Nel presente disegno sperimentale, i livelli proteici totali di GLUT1 non hanno mostrato variazioni statisticamente significative in nessuno dei gruppi sottoposti a trattamento farmacologico rispetto al controllo non trattato. Nonostante ciò, un incremento nei livelli di tale trasportatore è stato evidenziato nei campioni esposti a Pt(IV)Ac-POA o temozolomide.

Questo riscontro suggerisce che l'apporto glicolitico fondamentale mediato costituzionalmente da GLUT1 non venga compromesso o ridotto quando le cellule U251 sono esposte a uno stress chimico di entità moderata, quale quello indotto dalla dose subletale IC_{25} . L'omeostasi di questo specifico trasportatore riflette la necessità primaria della cellula tumorale di preservare i canali di importazione nutrizionale di base anche in condizioni di parziale sofferenza (Ruchika et al., 2024). Tuttavia, sotto il profilo morfologico, le indagini condotte in immunofluorescenza hanno rivelato una transizione nella distribuzione intracellulare della proteina. A differenza dei campioni di controllo, in cui il segnale associato a GLUT1 appare localizzato in modo definito lungo il perimetro cellulare della membrana plasmatica, i campioni trattati con Cisplatino, con i complessi innovativi al Platino e con TMZ mostrano una marcatura marcatamente diffusa nel compartimento citoplasmatico. Tale fenomeno evidenzia un'alterazione nei meccanismi di compartimentazione e del traffico trans-membrana dell'isoforma. La perdita della corretta esposizione superficiale di GLUT1, pur in presenza di una stabilità quantitativa della proteina totale, potrebbe preludere a una riduzione dell'efficienza cinetica di trasporto del glucosio, rappresentando un indice precoce di sofferenza indotto dall'insulto farmacologico (Ruchika et al., 2024).

A differenza della stabilità quantitativa osservata per l'isoforma basale, il trasportatore ad alta affinità GLUT3 è risultato il marcatore più significativamente modulato all'interno del disegno sperimentale. Sebbene l'espressione di GLUT3 sia fisiologicamente ristretta al compartimento neuronale, la sua marcata up-regolazione nel glioblastoma è documentata e correla con l'acquisizione di un fenotipo aggressivo, staminale e chemioresistente, spesso guidato dalle condizioni di ipossia che caratterizzano il microambiente tumorale (Mueckler et al., 2013; Feldman et al., 2024). L'analisi quantitativa condotta nel nostro studio ha rivelato una tendenza generalizzata alla contrazione dei livelli di GLUT3 in risposta a tutti i trattamenti somministrati, evidenziando come questo trasportatore rappresenti un bersaglio molecolare particolarmente sensibile allo stress terapeutico. Sotto il profilo comparativo, l'esposizione a Cisplatino e al complesso di Platino (II) $Pt(acac)_2(DMS)$ ha determinato un crollo severo e statisticamente significativo dell'espressione della proteina. Questo decremento riflette una spiccata vulnerabilità dell'asse glicolitico dipendente da GLUT3 nei confronti dell'azione citotossica diretta esercitata da questi due agenti platinanti. Al contrario, il profarmaco ottaedrico $Pt(IV)Ac - POA$ e l'agente alchilante standard TMZ hanno indotto una diminuzione più contenuta. Questa divergenza quantitativa trova un riscontro nell'indagine immunocitochimica: mentre nel controllo, nel Cisplatino e nel $Pt(acac)_2(DMS)$ il segnale di GLUT3 si concentra in *cluster* granulari perinucleari ben definiti – compatibili con i siti di sintesi e di accumulo d'organello –, nei campioni esposti a $Pt(IV)Ac - POA$ e TMZ si osserva una marcata dispersione della fluorescenza nel citosol.

Tale disorganizzazione strutturale del *network* intracellulare suggerisce che il profarmaco al Plat(IV) e la TMZ non inducano un abbattimento drastico della sintesi di GLUT3, bensì un'alterazione profonda dei suoi *pathways* di stoccaggio e localizzazione, riflettendo la complessità dei meccanismi adattativi attivati dalle cellule U251 alla dose subletale (Feldman et al., 2024).

Per valutare lo stato del compartimento mitocondriale in seguito all'induzione di stress farmacologico subletale, è stata monitorata l'espressione di ATP5A, una subunità catalitica fondamentale del complesso dell'ATP sintasi (complesso V), localizzata a livello della membrana mitocondriale interna. L'analisi quantitativa tramite Western blot ha rivelato una tendenza uniforme all'incremento dei livelli proteici di ATP5A in tutti i gruppi trattati rispetto al controllo non trattato, sebbene tale incremento non abbia raggiunto la significatività statistica a causa della variabilità biologica inter-campione. Questo riscontro assume un notevole interesse comparativo se confrontato con le evidenze precedentemente ottenute esponendo le cellule U251 a dosi massive pari alla IC_{50} . In tali condizioni ad alta citotossicità, l'azione dei composti determinava un severo danno d'organello, il collasso del potenziale di membrana mitocondriale e la netta *down-regolazione* dei marker strutturali e della catena respiratoria, propedeutici all'innescò delle vie di morte cellulare (Ferrari et al., 2021; Gaiaschi et al., 2026). Nello scenario subletale indotto dalla dose IC_{25} , invece, la stabilità o il *trend* positivo nell'espressione di ATP5A documenta come la componente respiratoria mitocondriale sia in grado di preservarsi, suggerendo l'innescò di un possibile meccanismo compensatorio o di una risposta adattativa finalizzata a sostenere la produzione energetica cellulare per far fronte al danno indotto dai farmaci, inclusi i derivati innovativi del Platino (IV) (Gaiaschi et al., 2026). Il mitocondrio, infatti, non agisce esclusivamente come centrale energetica passiva, ma risponde attivamente agli stress omeostatici intracellulari modulando l'espressione dei propri complessi macromolecolari nel tentativo di garantire la sopravvivenza della quota cellulare resistente (Bock et al., 2020).

Sotto il profilo morfologico, tuttavia, le indagini condotte in immunofluorescenza hanno messo in luce una transizione strutturale del segnale intracellulare di ATP5A. Nei campioni di controllo, la marcatura si presenta distribuita in un *network* continuo, allungato e tipicamente reticolare; al contrario, nei campioni esposti a Cisplatino, $Pt(IV)Ac - POA$ e TMZ, la fluorescenza assume un aspetto marcatamente puntiforme e frammentato. È opportuno evidenziare, in un'ottica di cautela metodologica, come l'indagine condotta su ATP5A mediante microscopia ottica convenzionale fornisca un'indicazione sulla massa e sulla distribuzione spaziale delle proteine stazionarie del compartimento, e non consenta di definire in modo diretto o univoco le cinetiche dei processi ultrastrutturali di fusione e fissione d'organello.

Ciononostante, la transizione verso un pattern spiccatamente disorganizzato può essere interpretata come un indizio microscopico preliminare di sofferenza cellulare e di alterazione dell'architettura mitocondriale. Tale quadro morfologico suggerisce che, malgrado la massa proteica dell'organello sia quantitativamente preservata alla dose subletale, la complessa struttura della rete mitocondriale risenta precocemente dello stress indotto dai trattamenti farmacologici (Bock et al., 2020), tracciando una linea di demarcazione tra la stabilità d'espressione della proteina e l'alterazione della sua corretta compartimentazione spaziale.

In un panorama metabolico rimodellato dall'azione dei trattamenti, l'analisi del fattore trascrizionale HIF-1 α ha evidenziato un andamento farmaco-dipendente. Fisiologicamente, HIF-1 α rappresenta il principale regolatore della risposta cellulare all'ipossia, un tratto distintivo e critico del microambiente del glioblastoma che ne guida l'aggressività, la transizione verso fenotipi staminali e la resistenza intrinseca sia alle terapie radianti sia ai chemioterapici di prima linea (Feldman et al., 2024; Bou-Gharios et al., 2024). Nel nostro disegno sperimentale, condotto in condizioni di normossia, l'esposizione delle cellule U251 alla dose subletale (IC_{25}) non ha mostrato differenze statisticamente significative nell'espressione globale di HIF-1 α rispetto al controllo basale. Tuttavia, un dato interessante emerge dal confronto diretto tra i diversi trattamenti: l'esposizione al derivato ottaedrico $Pt(IV)Ac - POA$ all'agente alchilante standard TMZ ha indotto un incremento marcato dei livelli proteici del fattore, la cui entità è risultata statisticamente superiore rispetto al profilo riscontrato per il Cisplatino. Inoltre, il profarmaco $Pt(IV)Ac - POA$ ha indotto livelli di HIF-1 α significativamente più elevati anche nei confronti del complesso di Platino (II) $Pt(acac)_2(DMS)$.

La stabilizzazione e l'accumulo di HIF-1 α in un contesto normossico, evocati da $Pt(IV)Ac - POA$ e TMZ, suggeriscono che questo fattore possa essere attivato in risposta a stress non ipossici, quali il danno al DNA o l'alterazione dell'omeostasi d'organello (Feldman et al., 2024; Bou-Gharios et al., 2024). Tradizionalmente, l'attivazione dell'asse indotto da HIF-1 α promuove lo *shift* verso l'effetto Warburg classico attraverso l'up-regolazione trascrizionale dei trasportatori GLUT e degli enzimi glicolitici (Bou-Gharios et al., 2025).

Tuttavia, è di fondamentale importanza evidenziare come nel nostro modello l'accumulo di HIF-1 α non si sia associato a un incremento parallelo dei livelli proteici totali di GLUT1 o GLUT3.

Questa netta dissociazione molecolare indica che la stabilizzazione del fattore non riflette l'innescio del programma glicolitico canonico. Al contrario, l'induzione coordinata di HIF-1 α da parte di $Pt(IV)Ac - POA$ e TMZ sembra agire come una via di segnalazione alternativa (Nafe et al., 2024).

A sostegno di questa ipotesi, le indagini di immunofluorescenza hanno rivelato una cruciale differenza nell'organizzazione compartimentale del fattore: mentre sotto l'effetto di TMZ HIF-1 α esibisce una netta e marcata localizzazione nucleare, nei trattamenti con i complessi al Platino il segnale appare prevalentemente confinato nel citoplasma o distribuito in modo diffuso. Questo contrasto risulta particolarmente evidente nel confronto diretto e a parità di espressione quantitativa totale tra TMZ e il profarmaco *Pt(IV)Ac – POA*: la massiva traslocazione nucleare indotta selettivamente dall'alchilante suggerisce un'attivazione trascrizionale funzionale ed efficiente del *checkpoint* in risposta al danno genotossico da TMZ, un evento che si realizza in misura significativamente minore nel caso del derivato ottaedrico del Platino.

6. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di caratterizzare il profilo di rimodellamento metabolico precoce messo in atto dalle cellule di glioblastoma U251 in risposta a insulti farmacologici subletali (IC_{25}). L'insieme dei dati raccolti evidenzia una transizione fenotipica farmaco-specifica di possibile interesse in particolare, i derivati del platino di nuova generazione sembrano esercitare un'attività antitumorale non limitata al danno genotossico ma che coinvolge anche la modulazione di circuiti di adattamento energetico del glioblastoma.

Il Cisplatino si è dimostrato l'agente più efficace, insieme $Pt(acac)_2(DMS)$, nel ridurre quantitativamente l'espressione di GLUT3, indicando una marcata compromissione della componente glicolitica della cellula tumorale. Tuttavia, tale effetto non si accompagna ad alterazioni sostanziali nella distribuzione intracellulare del trasportatore, suggerendo un'azione prevalentemente rivolta alla soppressione della sintesi o alla stabilità proteica.

Diversamente, le molecole $Pt(IV)Ac-POA$ e $Pt(acac)_2(DMS)$, similmente a quanto osservato nei trattati con TMZ, pur inducendo una riduzione meno marcata dei livelli complessivi di GLUT3, hanno determinato variazione nella localizzazione subcellulare sia di GLUT3 sia di GLUT1, con perdita della tipica distribuzione in cluster perinucleari e diffusione del segnale nel citoplasma. Tale osservazione suggerisce che questo composto possa compromettere il corretto traffico intracellulare, la maturazione e la funzionalità dei trasportatori del glucosio. Da questo punto di vista, la semplice quantificazione proteica potrebbe sottostimare l'effettivo impatto esercitato dalle molecole.

Un comportamento analogo emerge anche per ATP5A. Sebbene l'espressione totale della proteina risulti sostanzialmente conservata, la marcata frammentazione della marcatura osservata dopo trattamento con $Pt(IV)Ac-POA$, così come con Cisplatino e TMZ, indica che il mantenimento dei livelli proteici non corrisponde necessariamente alla conservazione della funzionalità respiratoria. Al contrario, la preservazione quantitativa di ATP5A può essere interpretata come un tentativo compensatorio della cellula di sostenere la produzione energetica in presenza di un possibile danno strutturale dei mitocondri.

Questa interpretazione trova ulteriore supporto nell'analisi di HIF-1 α . In condizioni di normossia nessun trattamento ha determinato variazioni statisticamente significative rispetto al controllo; tuttavia, il confronto diretto tra i gruppi evidenzia un incremento dei livelli di HIF-1 α nelle cellule trattate con $Pt(IV)Ac-POA$ e TMZ. In particolare, nel gruppo TMZ la marcata traslocazione nucleare del fattore suggerisce l'attivazione del programma trascrizionale HIF-dipendente, noto promotore di adattamento metabolico, sopravvivenza cellulare e farmacoresistenza nel glioblastoma.

L'aumento osservato dopo trattamento con Pt(IV)Ac-POA appare invece meno associato ad una piena riorganizzazione metabolica, poiché si accompagna contemporaneamente ad una evidente disorganizzazione dei sistemi deputati all'importazione del glucosio e ad alterazioni della morfologia mitocondriale. Ne consegue che l'attivazione di HIF-1 α potrebbe rappresentare una risposta precoce allo stress, insufficiente a ristabilire un'efficiente omeostasi energetica.

Le apparenti discrepanze tra i dati quantitativi e quelli morfologici non devono pertanto essere considerate contraddittorie, ma piuttosto come espressione delle diverse fasi della risposta adattativa al trattamento farmacologico. L'aumento o il mantenimento dei livelli di alcune proteine metaboliche può riflettere un tentativo della cellula di compensare il danno subito; tuttavia, la contemporanea perdita della loro corretta organizzazione subcellulare suggerisce che tale risposta risulti almeno parzialmente inefficace.

Dal confronto complessivo tra i composti studiati emerge inoltre una differenza tra i due derivati del platino. Pt(acac)₂(DMS), esercita una marcata attività citotossica attraverso una soppressione diretta dell'asse glicolitico con un'azione grossolanamente sovrapponibile a quanto osservato nelle cellule esposte a cisplatino; Pt(IV)Ac-POA, invece, sembra interferire con molteplici livelli della plasticità metabolica cellulare, alterando l'organizzazione dei trasportatori del glucosio, inducendo modificazioni della rete mitocondriale e limitando la capacità della cellula di instaurare un adattamento metabolico pienamente efficace. Questa azione multilivello rappresenta un potenziale vantaggio rispetto sia al Cisplatino, il cui effetto appare più circoscritto, sia alla TMZ, nella quale l'attivazione nucleare di HIF-1 α suggerisce invece l'insuccesso di programmi molecolari favorevoli alla sopravvivenza e alla futura acquisizione di resistenza.

Dal punto di vista traslazionale, questi risultati indicano che l'efficacia dei nuovi derivati del platino potrebbe essere ulteriormente potenziata mediante strategie di combinazione volte a impedire l'adattamento metabolico residuo.

L'identificazione di queste risposte plastiche e difensive offre spunti nel panorama della ricerca traslazionale sul glioblastoma, in cui la comprensione degli adattamenti bioenergetici indotti dalle terapie rappresenta la chiave per lo sviluppo di strategie combinate capaci di prevenire le recidive tumorali e superare la chemioresistenza (De Maria et al., 2024; Zhao et al., 2024).

In quest'ottica, i risultati ottenuti pongono le basi per futuri sviluppi sperimentali, volti a superare i limiti intrinseci delle indagini preliminari finora condotte. Poiché le indagini in immunofluorescenza hanno rivelato un'alterazione nella corretta compartimentazione e localizzazione di membrana di GLUT1 e GLUT3, sarebbe utile valutare l'effettivo *uptake* di glucosio e il suo metabolismo intracellulare (Zhao et al., 2024; Chung et al., 2025).

Inoltre, per approfondire le ragioni della distribuzione puntinata del segnale per ATP5A emersa in alcune condizioni sperimentali, sarebbero di interesse indagini microscopiche a super-risoluzione (come la microscopia confocale o STED) accoppiate a valutazioni in tempo reale della respirazione mitocondriale mediante (Ballen et al., 2024).

Infine, l'evidenza che le cellule U251 tentino di sopravvivere coordinando l'asse di HIF-1 α e l'omeostasi mitocondriale suggerisce che l'inibizione farmacologica mirata di questo specifico fattore, somministrata in concomitanza con i complessi innovativi al Platino(IV) o con la TMZ, potrebbe cortocircuitare le capacità di compenso del tumore, massimizzando l'efficacia terapeutica e riducendo la quota di cellule chemioresistenti (Ballen et al., 2024; Chung et al., 2025).

7. BIBLIOGRAFIA

1. Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M. Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol.* novembre 2012;24(6):650–4. doi:[10.1097/CCO.0b013e328356da72](https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e328356da72) PubMed PMID: 22913968; PubMed Central PMCID: PMC6392426.
2. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer.* gennaio 2020;20(1):26–41. doi:[10.1038/s41568-019-0205-x](https://doi.org/10.1038/s41568-019-0205-x) PubMed PMID: 31601988; PubMed Central PMCID: PMC8246629.
3. Astesana V, Faris P, Ferrari B, Siciliani S, Lim D, Biggiogera M, et al. [Pt(O,O'-acac)(γ-acac)(DMS)]: Alternative Strategies to Overcome Cisplatin-Induced Side Effects and Resistance in T98G Glioma Cells. *Cell Mol Neurobiol.* 19 maggio 2020;41(3):563–87. doi:[10.1007/s10571-020-00873-8](https://doi.org/10.1007/s10571-020-00873-8) PubMed PMID: 32430779; PubMed Central PMCID: PMC11448674.
4. Atif F, Yousuf S, Stein DG. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* febbraio 2015;146:62–73. doi:[10.1016/j.jsbmb.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.007) PubMed PMID: 24787660.
5. Beylerli O, Sufianova G, Shumadalova A, Zhang D, Gareev I. MicroRNAs-mediated regulation of glucose transporter (GLUT) expression in glioblastoma. *Noncoding RNA Res.* 6 settembre 2022;7(4):205–11. doi:[10.1016/j.ncrna.2022.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2022.09.001) PubMed PMID: 36157351; PubMed Central PMCID: PMC9467858.
6. Bhaduri A, Di Lullo E, Jung D, Müller S, Crouch EE, Sandoval Espinosa C, et al. Outer Radial Glia-Like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 2 gennaio 2020;26(1):48-63.e6. doi:[10.1016/j.stem.2019.11.015](https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.015) PubMed PMID: 31901251; PubMed Central PMCID: PMC7029801.
7. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* febbraio 2020;21(2):85–100. doi:[10.1038/s41580-019-0173-8](https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8) PubMed PMID: 31636403.
8. Bou-Gharios J, Noël G, Burckel H. Preclinical and clinical advances to overcome hypoxia in glioblastoma multiforme. *Cell Death Dis.* 13 luglio 2024;15(7):503. doi:[10.1038/s41419-024-06904-2](https://doi.org/10.1038/s41419-024-06904-2) PubMed PMID: 39003252; PubMed Central PMCID: PMC11246422.

9. Bou-Gharios J, Noël G, Burckel H. The neglected burden of chronic hypoxia on the resistance of glioblastoma multiforme to first-line therapies. *BMC Biol.* 28 novembre 2024;22(1):278. doi:[10.1186/s12915-024-02075-w](https://doi.org/10.1186/s12915-024-02075-w) PubMed PMID: 39609830; PubMed Central PMCID: PMC11603919.

10. Chung J, Saad J, Kafri A, Rossignol J, Verbrugge M, Bakke J. Metabolism of glioblastoma: a review of metabolic adaptations and metabolic therapeutic interventions. *Front Oncol.* 15:1712576. doi:[10.3389/fonc.2025.1712576](https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1712576) PubMed PMID: 41450919; PubMed Central PMCID: PMC12727627.

11. Cortes Ballen, Amosu M, Ravinder S, Chan J, Derin E, Slika H, et al. Metabolic Reprogramming in Glioblastoma Multiforme: A Review of Pathways and Therapeutic Targets. *Cells.* 19 settembre 2024;13(18):1574. doi:[10.3390/cells13181574](https://doi.org/10.3390/cells13181574) PubMed PMID: 39329757; PubMed Central PMCID: PMC11430559.

12. De Maria L, Panciani PP, Zeppieri M, Ius T, Seriola S, Piazza A, et al. A Systematic Review of the Metabolism of High-Grade Gliomas: Current Targeted Therapies and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 5 gennaio 2024;25(2):724. doi:[10.3390/ijms25020724](https://doi.org/10.3390/ijms25020724) PubMed PMID: 38255798; PubMed Central PMCID: PMC10815583.

13. Feldman L. Hypoxia within the glioblastoma tumor microenvironment: a master saboteur of novel treatments. *Front Immunol.* 2024;15:1384249. doi:[10.3389/fimmu.2024.1384249](https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1384249) PubMed PMID: 38994360; PubMed Central PMCID: PMC11238147.

14. Ferrari B, Roda E, Priori EC, De Luca F, Facoetti A, Ravera M, et al. A New Platinum-Based Prodrug Candidate for Chemotherapy and Its Synergistic Effect With Hadrontherapy: Novel Strategy to Treat Glioblastoma. *Front Neurosci.* 2021;15:589906. doi:[10.3389/fnins.2021.589906](https://doi.org/10.3389/fnins.2021.589906) PubMed PMID: 33828444; PubMed Central PMCID: PMC8019820.

15. Flavahan WA, Wu Q, Hitomi M, Rahim N, Kim Y, Sloan AE, et al. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci.* ottobre 2013;16(10):1373–82. doi:[10.1038/nn.3510](https://doi.org/10.1038/nn.3510) PubMed PMID: 23995067; PubMed Central PMCID: PMC3930177.

16. Gaiaschi L, De Luca F, Girelli CR, Milanesi G, Roda E, Fanizzi FP, et al. In vitro cytotoxic mechanisms of Pt(O,O'-acac)(γ -acac)(DMS): mitochondrial dysfunction and impaired autophagy in U251 cell line. *Cell Death Discov.* 9 gennaio 2026;12(1):79. doi:[10.1038/s41420-025-02918-7](https://doi.org/10.1038/s41420-025-02918-7).
17. Gaiaschi L, Bottone MG, De Luca F. Towards Effective Treatment of Glioblastoma: The Role of Combination Therapies and the Potential of Phytotherapy and Micotherapy. *Curr Issues Mol Biol.* 19 dicembre 2024;46(12):14324–50. doi:[10.3390/cimb46120859](https://doi.org/10.3390/cimb46120859) PubMed PMID: 39727987; PubMed Central PMCID: PMC11674107.
18. Gaiaschi L, Casali C, Stabile A, D'Amico S, Ravera M, Gabano E, et al. DNA Damage Repair in Glioblastoma: A Novel Approach to Combat Drug Resistance. *Cell Prolif.* giugno 2025;58(6):e13815. doi:[10.1111/cpr.13815](https://doi.org/10.1111/cpr.13815) PubMed PMID: 39866010; PubMed Central PMCID: PMC12179567.
19. Gaiaschi L, De Luca F, Roda E, Ferrari B, Casali C, Inguscio CR, et al. A Phyto-mycotherapeutic Supplement, Namely Ganostile, as Effective Adjuvant in Brain Cancer Management: An In Vitro Study Using U251 Human Glioblastoma Cell Line. *Int J Mol Sci.* 5 giugno 2024;25(11):6204. doi:[10.3390/ijms25116204](https://doi.org/10.3390/ijms25116204) PubMed PMID: 38892392; PubMed Central PMCID: PMC11172483.
20. Gaiaschi L, De Luca F, Roda E, Ferrari B, Casali C, Inguscio CR, et al. A Phyto-mycotherapeutic Supplement, Namely Ganostile, as Effective Adjuvant in Brain Cancer Management: An In Vitro Study Using U251 Human Glioblastoma Cell Line. *Int J Mol Sci.* 5 giugno 2024;25(11):6204. doi:[10.3390/ijms25116204](https://doi.org/10.3390/ijms25116204) PubMed PMID: 38892392; PubMed Central PMCID: PMC11172483.
21. Gaiaschi L, De Luca F, Serapian SA, Lugli E, Maraschi F, Bini A, et al. In Vitro Anti-Glioblastoma Activity of a Novel Pt(IV)-Ganoderic Acid A Conjugate. *Int J Mol Sci.* 18 marzo 2026;27(6):2760. doi:[10.3390/ijms27062760](https://doi.org/10.3390/ijms27062760) PubMed PMID: 41898619; PubMed Central PMCID: PMC13026249.
22. Gaiaschi L, Favaron C, Casali C, Gola F, De Luca F, Ravera M, et al. Study on the activation of cell death mechanisms: in search of new therapeutic targets in glioblastoma multiforme. *Apoptosis.* 2023;28(7–8):1241–57. doi:[10.1007/s10495-023-01857-x](https://doi.org/10.1007/s10495-023-01857-x) PubMed PMID: 37244884; PubMed Central PMCID: PMC10333377.

23. Gaiaschi L, Roda E, Favaron C, Gola F, Gabano E, Ravera M, et al. The power of a novel combined anticancer therapy: challenge and opportunity of micotherapy in the treatment of Glioblastoma Multiforme. *Biomed Pharmacother.* novembre 2022;155:113729. doi:[10.1016/j.biopha.2022.113729](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113729) PubMed PMID: 36166961.
24. Gokani V, Kotta A, Repaka V, Rauniyar S, Noch EK. Targeting Metabolic Vulnerabilities in Glioblastoma: a Framework for Multi-node Combination Therapy. *Curr Oncol Rep.* 2026;28(1):19. doi:[10.1007/s11912-026-01746-x](https://doi.org/10.1007/s11912-026-01746-x) PubMed PMID: 41718834; PubMed Central PMCID: PMC12923475.
25. Guda MR, Labak CM, Omar SI, Asuthkar S, Airala S, Tuszynski J, et al. GLUT1 and TUBB4 in Glioblastoma Could be Efficacious Targets. *Cancers (Basel).* 5 settembre 2019;11(9):1308. doi:[10.3390/cancers11091308](https://doi.org/10.3390/cancers11091308) PubMed PMID: 31491891; PubMed Central PMCID: PMC6771132.
26. Hagiwara F, Omata D, Munakata L, Kageyama S, Maruyama K, Kudo N, et al. Brain Delivery of Cisplatin Using Microbubbles in Combination with Ultrasound as an Effective Therapy for Glioblastoma. *Pharmaceuticals (Basel).* 13 novembre 2023;16(11):1599. doi:[10.3390/ph16111599](https://doi.org/10.3390/ph16111599) PubMed PMID: 38004464; PubMed Central PMCID: PMC10675703.
27. Hu C, Leche CA, Kiyatkin A, Yu Z, Stayrook SE, Ferguson KM, et al. Glioblastoma mutations alter EGFR dimer structure to prevent ligand bias. *Nature.* febbraio 2022;602(7897):518–22. doi:[10.1038/s41586-021-04393-3](https://doi.org/10.1038/s41586-021-04393-3) PubMed PMID: 35140400; PubMed Central PMCID: PMC8857055.
28. Jeon J, Lee S, Kim H, Kang H, Youn H, Jo S, et al. Revisiting Platinum-Based Anticancer Drugs to Overcome Gliomas. *Int J Mol Sci.* 12 maggio 2021;22(10):5111. doi:[10.3390/ijms22105111](https://doi.org/10.3390/ijms22105111) PubMed PMID: 34065991; PubMed Central PMCID: PMC8151298.
29. Jin X, Kuang Y, Li L, Li H, Zhao T, He Y, et al. A positive feedback circuit comprising p21 and HIF-1 α aggravates hypoxia-induced radioresistance of glioblastoma by promoting Glut1/LDHA-mediated glycolysis. *FASEB J.* marzo 2022;36(3):e22229. doi:[10.1096/fj.202101736R](https://doi.org/10.1096/fj.202101736R) PubMed PMID: 35199870.

30. Kim HI, Lee SJ, Choi YJ, Kim MJ, Kim TY, Ko SG. Quercetin Induces Apoptosis in Glioblastoma Cells by Suppressing Ax1/IL-6/STAT3 Signaling Pathway. *Am J Chin Med.* 2021;49(3):767–84. doi:[10.1142/S0192415X21500361](https://doi.org/10.1142/S0192415X21500361) PubMed PMID: 33657989.
31. Kulavi S, Dhar D, Kamal IM, Chakrabarti S, Bandyopadhyay J. EIF4A3 targeted therapeutic intervention in glioblastoma multiforme using phytochemicals from Indian medicinal plants - an integration of phytotherapy into precision onco-medicine. *J Biomol Struct Dyn.* agosto 2025;43(12):5849–69. doi:[10.1080/07391102.2024.2314257](https://doi.org/10.1080/07391102.2024.2314257) PubMed PMID: 38345073.
32. Lan Z, Li X, Zhang X. Glioblastoma: An Update in Pathology, Molecular Mechanisms and Biomarkers. *Int J Mol Sci.* 6 marzo 2024;25(5):3040. doi:[10.3390/ijms25053040](https://doi.org/10.3390/ijms25053040) PubMed PMID: 38474286; PubMed Central PMCID: PMC10931698.
33. Li W, Wang Z, Chen S, Zuo M, Xiang Y, Yuan Y, et al. Metabolic checkpoints in glioblastomas: targets for new therapies and non-invasive detection. *Front Oncol.* 29 novembre 2024;14:1462424. doi:[10.3389/fonc.2024.1462424](https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1462424) PubMed PMID: 39678512; PubMed Central PMCID: PMC11638224.
34. Liu Y, Song X, Wu M, Wu J, Liu J. Synergistic Effects of Resveratrol and Temozolomide Against Glioblastoma Cells: Underlying Mechanism and Therapeutic Implications. *Cancer Manag Res.* 11 settembre 2020;12:8341–54. doi:[10.2147/CMAR.S258584](https://doi.org/10.2147/CMAR.S258584) PubMed PMID: 32982428; PubMed Central PMCID: PMC7494018.
35. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 29 giugno 2021;23(8):1231–51. doi:[10.1093/neuonc/noab106](https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106) PubMed PMID: 34185076; PubMed Central PMCID: PMC8328013.
36. Mazzoleni A, Wireko AA, Sanker V, Bharadwaj R, Aderinto N, Tan JK, et al. Chromosomal instability: a key driver in glioma pathogenesis and progression. *European Journal of Medical Research.* 4 settembre 2024;29. doi:[10.1186/s40001-024-02043-8](https://doi.org/10.1186/s40001-024-02043-8)
37. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2–3):121–38. doi:[10.1016/j.mam.2012.07.001](https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001) PubMed PMID: 23506862; PubMed Central PMCID: PMC4104978.

38. Nafe R, Hattingen E. Forms of Non-Apoptotic Cell Death and Their Role in Gliomas-Presentation of the Current State of Knowledge. *Biomedicines*. 11 luglio 2024;12(7):1546. doi:[10.3390/biomedicines12071546](https://doi.org/10.3390/biomedicines12071546) PubMed PMID: 39062119; PubMed Central PMCID: PMC11274595.
39. Natu A, Verma T, Khade B, Thorat R, Gera P, Dhara S, et al. Histone acetylation: a key determinant of acquired cisplatin resistance in cancer. *Clin Epigenetics*. 3 gennaio 2024;16(1):8. doi:[10.1186/s13148-023-01615-5](https://doi.org/10.1186/s13148-023-01615-5) PubMed PMID: 38172984; PubMed Central PMCID: PMC10765630.
40. Noorbakhsh Varnosfaderani SM, Ebrahimzadeh F, Akbari Oryani M, Khalili S, Almasi F, Mosaddeghi Heris R, et al. Potential promising anticancer applications of β -glucans: a review. *Biosci Rep*. 31 gennaio 2024;44(1):BSR20231686. doi:[10.1042/BSR20231686](https://doi.org/10.1042/BSR20231686) PubMed PMID: 38088444; PubMed Central PMCID: PMC10776902.
41. Odarenko KV, Sen'kova AV, Salomatina OV, Markov OV, Salakhutdinov NF, Zenkova MA, et al. Soloxolone para-methylanilide effectively suppresses aggressive phenotype of glioblastoma cells including TGF- β 1-induced glial-mesenchymal transition in vitro and inhibits growth of U87 glioblastoma xenografts in mice. *Front Pharmacol*. 2024;15:1428924. doi:[10.3389/fphar.2024.1428924](https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1428924) PubMed PMID: 39135794; PubMed Central PMCID: PMC11317440.
42. Olympios N, Gilard V, Marguet F, Clatot F, Di Fiore F, Fontanilles M. TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 8 marzo 2021;13(5):1147. doi:[10.3390/cancers13051147](https://doi.org/10.3390/cancers13051147) PubMed PMID: 33800183; PubMed Central PMCID: PMC7962450.
43. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol*. 1 ottobre 2018;20(suppl_4):iv1–86. doi:[10.1093/neuonc/nyy131](https://doi.org/10.1093/neuonc/nyy131) PubMed PMID: 30445539; PubMed Central PMCID: PMC6129949.
44. Palma TV, Lenz LS, Bottari NB, Pereira A, Schetinger MRC, Morsch VM, et al. Berberine induces apoptosis in glioblastoma multiforme U87MG cells via oxidative stress and independent of AMPK activity. *Mol Biol Rep*. giugno 2020;47(6):4393–400. doi:[10.1007/s11033-020-05500-9](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05500-9) PubMed PMID: 32410137.

45. Pouyan A, Ghorbanlo M, Eslami M, Jahanshahi M, Ziaei E, Salami A, et al. Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. *Mol Cancer*. 26 febbraio 2025;24(1):58. doi:[10.1186/s12943-025-02267-0](https://doi.org/10.1186/s12943-025-02267-0) PubMed PMID: 40011944; PubMed Central PMCID: PMC11863469.
46. Roda E, Bottone MG. Editorial: Brain Cancers: New Perspectives and Therapies. *Front Neurosci*. 14 febbraio 2022;16. doi:[10.3389/fnins.2022.857408](https://doi.org/10.3389/fnins.2022.857408)
47. Rong J, Wang Q, Li T, Qian J, Cheng J. Glucose metabolism in glioma: an emerging sight with ncRNAs. *Cancer Cell Int*. 13 settembre 2024;24(1):316. doi:[10.1186/s12935-024-03499-8](https://doi.org/10.1186/s12935-024-03499-8) PubMed PMID: 39272133; PubMed Central PMCID: PMC11395608.
48. Ruchika F, Suvarnapathaki S, Serrano-Farias A, Bettegowda C, Rincon-Torroella J. GLUT1 as a Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Brain Sci*. 28 maggio 2025;15(6):585. doi:[10.3390/brainsci15060585](https://doi.org/10.3390/brainsci15060585) PubMed PMID: 40563757; PubMed Central PMCID: PMC12190696.
49. Rybarczyk A, Majchrzak-Celińska A, Krajka-Kuźniak V. Synergistic combination of cannabidiol and celecoxib or 2,5-dimethylcelecoxib exerts oxidative stress-mediated cytotoxicity and mitigates glioblastoma invasiveness. *Acta Biochim Pol*. 29 settembre 2025;72:15062. doi:[10.3389/abp.2025.15062](https://doi.org/10.3389/abp.2025.15062) PubMed PMID: 41089524; PubMed Central PMCID: PMC12515732.
50. Semenza GL. Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 6 gennaio 2019;59:379–403. doi:[10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637) PubMed PMID: 30625281.
51. Serafino A, Krasnowska EK, Romanò S, De Gregorio A, Colone M, Dupuis ML, et al. The Synergistic Combination of Curcumin and Polydatin Improves Temozolomide Efficacy on Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci*. 30 settembre 2024;25(19):10572. doi:[10.3390/ijms251910572](https://doi.org/10.3390/ijms251910572) PubMed PMID: 39408901; PubMed Central PMCID: PMC11477178.
52. Shah S, Mansour HM, Aguilar TM, Lucke-Wold B. Advances in Anti-Cancer Drug Development: Metformin as Anti-Angiogenic Supplemental Treatment for Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 23 maggio 2024;25(11):5694. doi:[10.3390/ijms25115694](https://doi.org/10.3390/ijms25115694) PubMed PMID: 38891882; PubMed Central PMCID: PMC11171521.

53. Silva J do N, Monção NBN, de Farias RRS, Citó AM das GL, Chaves MH, Araújo MRS de, et al. Toxicological, chemopreventive, and cytotoxic potentialities of rare vegetal species and supporting findings for the Brazilian Unified Health System (SUS). *J Toxicol Environ Health A*. 17 luglio 2020;83(13–14):525–45. doi:[10.1080/15287394.2020.1780658](https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1780658) PubMed PMID: 32568625.
54. Simpson IA, Dwyer D, Malide D, Moley KH, Travis A, Vannucci SJ. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. agosto 2008;295(2):E242–53. doi:[10.1152/ajpendo.90388.2008](https://doi.org/10.1152/ajpendo.90388.2008) PubMed PMID: 18577699; PubMed Central PMCID: PMC2519757.
55. Strickland M, Stoll EA. Metabolic Reprogramming in Glioma. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:43. doi:[10.3389/fcell.2017.00043](https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00043) PubMed PMID: 28491867; PubMed Central PMCID: PMC5405080.
56. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 marzo 2005;352(10):987–96. doi:[10.1056/NEJMoa043330](https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330) PubMed PMID: 15758009.
57. Tomar MS, Kumar A, Srivastava C, Shrivastava A. Elucidating the mechanisms of Temozolomide resistance in gliomas and the strategies to overcome the resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. dicembre 2021;1876(2):188616. doi:[10.1016/j.bbcan.2021.188616](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188616) PubMed PMID: 34419533.
58. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro Oncol*. 17 agosto 2020;22(8):1073–113. doi:[10.1093/neuonc/noaa106](https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa106) PubMed PMID: 32328653; PubMed Central PMCID: PMC7594557.
59. Yang Y, Zhou H, Liu W, Wu J, Yue X, Wang J, et al. Ganoderic acid A exerts antitumor activity against MDA-MB-231 human breast cancer cells by inhibiting the Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. *Oncol Lett*. novembre 2018;16(5):6515–21. doi:[10.3892/ol.2018.9475](https://doi.org/10.3892/ol.2018.9475) PubMed PMID: 30405790; PubMed Central PMCID: PMC6202552.

60. Zhao J, Ma X, Gao P, Han X, Zhao P, Xie F, et al. Advancing glioblastoma treatment by targeting metabolism. *Neoplasia*. 12 marzo 2024;51:100985. doi:[10.1016/j.neo.2024.100985](https://doi.org/10.1016/j.neo.2024.100985) PubMed PMID: 38479191; PubMed Central PMCID: PMC10950892.
61. Zhu F, Qiu J, Ye H, Su W, Wang R, Fu Y. The Prognostic Significance of Epidermal Growth Factor Receptor Amplification and Epidermal Growth Factor Receptor Variant III Mutation in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis with Implications for Targeted Therapy. *Int J Mol Sci*. 9 aprile 2025;26(8):3539. doi:[10.3390/ijms26083539](https://doi.org/10.3390/ijms26083539) PubMed PMID: 40331985; PubMed Central PMCID: PMC12027172.
62. Zou Y, Xu L, Wang W, Zhu X, Lin J, Li H, et al. Muscone restores anoikis sensitivity in TMZ-resistant glioblastoma cells by suppressing TOP2A *via* the EGFR/Integrin β 1/FAK signaling pathway. *Phytomedicine*. 1 luglio 2024;129:155714. doi:[10.1016/j.phymed.2024.155714](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155714)