



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**Ruolo dello stress ossidativo e infiammatorio nella regolazione
dei meccanismi migratori del glioblastoma: coinvolgimento di
PDGFR α , cathepsine e rimodellamento della matrice
extracellulare**

Relatore:

Dr.ssa Ludovica Gaiaschi

Correlatore:

Prof.ssa Maria Grazia Bottone

Tesi Sperimentale di
Benedetta Galli

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1 INTRODUZIONE	5
1.1. I tumori del sistema nervoso centrale	5
1.1.1 Classificazione dei gliomi	6
1.1.2 Gliomi primari e secondari e interazione con l'ECM	8
1.2 Il glioblastoma	9
1.2.1 Caratteristiche istopatologiche del glioblastoma	12
1.2.2 Caratteristiche molecolari del glioblastoma	16
1.2.3 Epigenetica e trascrittomica del glioblastoma	20
1.3 La patogenesi del glioblastoma	21
1.4 Sintomi e diagnosi del glioblastoma	23
1.5 Microambiente tumorale dl glioblastoma	24
1.6 Invasione e migrazione cellulare nel glioblastoma	30
2 SCOPO DEL LAVORO	33
3 MATERIALI E METODI	34
3.1 Coltura cellulare	34
3.1.1 Trattamenti	34
3.2 Saggio MTT	34
3.3 Western blotting	35
3.3.1 Preparazione dei lisati proteici	35
3.3.2 Quantificazione proteica e preparazione dei campioni	36
3.3.3 SDS-PAGE	36
3.3.4 Trasferimento su membrana e controllo del trasferimento	36
3.3.5 Controllo del trasferimento, blocco e incubazioni anticorpali	37
3.3.6 Rivelazione (ECL) e acquisizione	37
3.4 Analisi di immunofluorescenza	38
3.5 Saggio di invasione e migrazione	39
3.5.1 Colorazione con Cristal Violetto	40
3.5.2 Analisi dei dati del saggio di invasione e migrazione	40
4 RISULTATI	42
4.1 Analisi western blot per la selezione delle condizioni sperimentali	42
4.3 Analisi della vitalità cellulare tramite saggio MTT	46
4.2 Analisi di immunofluorescenza di WFDC2 e MMP2	47
4.4 Analisi dell'attività migratoria	59
4.5 Analisi dell'attività invasiva	64
5 DISCUSSIONE	66
6 CONCLUSIONI	70

7 BIBLIOGRAFIA.....	71
----------------------------	-----------

I tumori del sistema nervoso centrale (SNC) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie primarie e possono essere distinti in primitivi e secondari in base alle loro caratteristiche biologiche.

I gliomi rappresentano il gruppo più frequente di tumori primitivi del SNC e comprendono diverse entità distinte, tra cui i gliomi diffusi di tipo adulto, gliomi diffusi di basso grado di tipo pediatrico, gliomi diffusi di alto grado di tipo pediatrico, gliomi astrocitari circoscritti, tumori glioneuroni e neuronali e ependimomi.

Tra i gliomi primari diffusi di tipo adulto è compreso il glioblastoma (GB), classificato come IDH-wildtype di grado 4, secondo la classificazione WHO, che rappresenta la forma più aggressiva.

Il glioblastoma è caratterizzato da rapida proliferazione, marcata eterogeneità genetica, resistenza ai trattamenti convenzionali ed elevata capacità infiltrativa, che consente alle cellule tumorali di diffondersi nel parenchima cerebrale circostante. Questa caratteristica limita l'efficacia della resezione chirurgica e favorisce la comparsa di recidive, contribuendo alla prognosi estremamente sfavorevole della malattia, con una sopravvivenza mediana di circa 15-16 mesi e una sopravvivenza a 5 anni del 5% circa.

Le metastasi del GB nel SNC sono associate a prognosi sfavorevole, elevata morbilità e mortalità. Le metastasi extracraniche, invece, sono rare e avvengono soprattutto in pazienti con precedenti interventi chirurgici invasivi o biopsie oppure si possono verificare attraverso la migrazione di cellule gliali nel liquido cerebrospinale.

La motilità delle cellule di glioblastoma dipende dall'interazione di numerosi pathway molecolari che regolano la migrazione cellulare e il rimodellamento della matrice extracellulare. Tali processi sono fortemente influenzati dalle caratteristiche del microambiente tumorale, tra cui stress ossidativo e infiammazione, che modulano il comportamento invasivo delle cellule neoplastiche.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di investigare i meccanismi molecolari e funzionali alla base della motilità delle cellule di glioblastoma, con particolare attenzione all'interazione tra stress ossidativo, risposta infiammatoria e pathway coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella motilità cellulare. Come principali metodologie sperimentali sono state utilizzate le colture cellulari, il saggio MTT, il western blotting, l'immunofluorescenza e saggio di invasione e migrazione.

L'analisi in immunofluorescenza ha riportato un aumento di WFDC2 nelle cellule esposte a H_2O_2 e nella condizione combinata con gli inibitori delle catepsine, mentre il trattamento con Imatinib ha mantenuto i livelli del marcatore comparabili a quelli del controllo. Analogamente, MMP2 è risultata aumentata in seguito all'induzione di stress ossidativo e dopo il trattamento con gli inibitori farmacologici delle catepsine, al contrario l'inibizione di PDGFR α ha riportato la sua espressione a livelli prossimi a quelli basali.

Poiché WFDC2 è noto promuovere l'attività delle metalloproteinasi attraverso la modulazione dei loro inibitori endogeni, l'aumento concomitante di WFDC2 e MMP2 suggerisce l'attivazione di un programma molecolare favorevole alla motilità cellulare in risposta allo stress ossidativo. Di particolare interesse è risultato l'effetto di Imatinib, che ha attenuato l'espressione di entrambi i marcatori, indicando un possibile coinvolgimento di PDGFR α nella regolazione di tali processi.

L'analisi morfologica ha inoltre mostrato che lo stress ossidativo porta ad una diminuzione più del numero di protrusioni ed a un aumento della loro lunghezza rispetto alle altre condizioni considerate, suggerendo una riorganizzazione del citoscheletro compatibile con un fenotipo maggiormente migratorio.

Coerentemente con questi risultati, i saggi funzionali hanno evidenziato un incremento della migrazione cellulare in seguito al trattamento con H₂O₂, effetto mantenuto anche in combinazione con gli inibitori delle cathepsine. Al contrario, la presenza di Imatinib in un contesto di stress ossidativo, coerentemente con le analisi molecolari, ha riportato ad una diminuzione della migrazione. Un andamento differente è emerso nelle condizioni pro-infiammatorie; la combinazione di LPS con gli inibitori delle cathepsine ha determinato una riduzione significativa della capacità migratoria, non emersa invece in presenza dell'inibitore di PDGFR α . I dati relativi all'invasione cellulare, sebbene ottenuti da un numero limitato di replicati biologici, hanno mostrato un andamento complessivamente sovrapponibile a quello osservato nei saggi di migrazione.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che stress ossidativo e infiammazione influenzano la motilità delle cellule di glioblastoma attraverso meccanismi in parte distinti ma funzionalmente integrati. In particolare, i dati suggeriscono un ruolo di PDGFR α nella risposta allo stress ossidativo e delle cathepsine nei processi associati al microambiente infiammatorio, fornendo nuove indicazioni sui meccanismi molecolari che regolano la diffusione locale del glioblastoma e che potrebbero rappresentare potenziali bersagli terapeutici.

1 INTRODUZIONE

1.1. I tumori del sistema nervoso centrale

I tumori del sistema nervoso centrale (SNC) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie primarie per quanto riguarda morfologia, sede d'insorgenza, aspetti biologici, clinici, prognostici ed eziologici. Possono essere di derivazione puramente neuronale oppure avere componenti neuronali e gliali miste; in quest'ultimo caso si parla di tumori glioneuronali. (Mezzacappa & Thorell, 2026)

Inoltre, questo gruppo di tumore ne include sia di natura maligna che di natura benigna. I tumori più frequenti del SNC sono rappresentati dai gliomi, dagli astrocitomi, dai medulloblastomi e dai meningiomi tra i quali il glioblastoma che è il più frequente tumore maligno del SNC e il meningioma, il tumore benigno più comune. (Salari et al., 2023)

Nel 2022, sono stati stimati 322.000 nuovi casi di tumori cerebrali e del sistema nervoso centrale a livello globale. Per paese e fascia d'età, Austria e Stati Uniti hanno mostrato i tassi più elevati nei ragazzi (3,5 in entrambi i casi), mentre, tra adolescenti e giovani adulti (AYA), la Norvegia ha registrato i tassi di incidenza più elevati sia nei maschi (4,7) che nelle femmine (3,8). Tra gli adulti (+ 40 anni), i tassi più elevati nei maschi sono stati osservati nei paesi del Nord Europa. (Filho et al., 2025)

I tumori del SNC possono essere distinti in primitivi e secondari in base alle loro caratteristiche biologiche.

I tumori cerebrali primitivi si originano dai tessuti del cervello o del SNC come il midollo spinale. Includono diverse forme, come gliomi e meningiomi, e possono essere sia benigni che maligni. La forma maligna è particolarmente difficile da curare a causa dell'aggressività biologica di questo tipo di tumori; a sopravvivenza a cinque anni è attualmente inferiore al 36%. (Ostrom et al., 2023)

Le neoplasie secondarie del SNC sono circa dieci volte più frequenti dei tumori cerebrali primitivi considerando anche il fatto che circa il 30% degli adulti affetti da cancro presenta metastasi al SNC. (Boire, 2020)

Inoltre le metastasi al SNC sono associate a prognosi sfavorevole, elevata morbilità e mortalità. In questi casi si parla di prognosi sfavorevole a causa delle limitate opzioni terapeutiche anche se oggi si hanno a disposizione sempre più terapie mirate con una buona penetrazione nel SNC oltre che una comprensione più approfondita dei fattori prognostici. (Malhotra et al., 2025; Wanleenuwat & Iwanowski, 2020)

Esistono diversi tipi di metastasi cerebrali che derivano da tumori primitivi con una differente localizzazione.

Le metastasi cerebrali parenchimali e leptomeningee derivano più spesso da tumori primitivi della mammella, del polmone o da melanoma mentre le metastasi spinali sono probabilmente il risultato di

tumori della mammella, del polmone, della prostata, della tiroide o del rene. A prescindere dal tumore primitivo di origine la comparsa di nuovi sintomi neurologici focali in un paziente oncologico dovrebbe far sospettare la presenza di metastasi al SNC. (Boire, 2020)

1.1.1 Classificazione dei gliomi

I tumori del SNC nella quinta edizione della classificazione da parte dell'OMS sono stati suddivisi in sei famiglie. La diversità istologica di questi tumori ha costituito la base della classificazione dei tumori del sistema nervoso centrale. (Bale & Rosenblum, 2022)

Nel 2021 nella quinta edizione della Classificazione dei Tumori del Sistema Nervoso Centrale pubblicata dall'OMS la classificazione dei gliomi ha subito cambiamenti importanti tanto è vero che per la prima volta, i gliomi di tipo adulto e pediatrico sono classificati separatamente sulla base delle differenze nella patogenesi molecolare e nella prognosi. (Berger et al., 2022)

L'OMS CNS5 ha adottato un nuovo approccio per classificare i gliomi, i tumori glioneuroni e i tumori neuronali, suddividendoli in 6 diverse famiglie:

- Gliomi diffusi di tipo adulto
- Gliomi diffusi di basso grado di tipo pediatrico
- Gliomi diffusi di alto grado di tipo pediatrico
- Gliomi astrocitari circoscritti
- Tumori glioneuroni e neuronali
- Ependimomi. (Louis et al., 2021)

Dall'OMS i gliomi diffusi di tipo adulto sono stati classificati in base alla presenza o all'assenza di mutazioni dell'isocitrato deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2), in base alla presenza di una delezione omozigote di CDKN2A/B e in base alla presenza di codelezione 1p/19q.

I gliomi diffusi di tipo adulto quindi sono assegnati a tre diversi tipi di tumore:

1. Astrocitoma, IDH-mutante: considerati un'unica entità classificata come grado 2, 3 o 4 dell'OMS a livello del SNC, a seconda delle diverse caratteristiche istologiche e molecolari. La presenza di una delezione omozigote di CDKN2A/B determina un astrocitoma con mutazione IDH di grado 4.
2. Oligodendroglioma: IDH-mutante e codelezione 1p/19q; possono essere classificati di grado 2 o 3.
3. Glioblastoma: IDH-wildtype; viene classificato di grado 4.

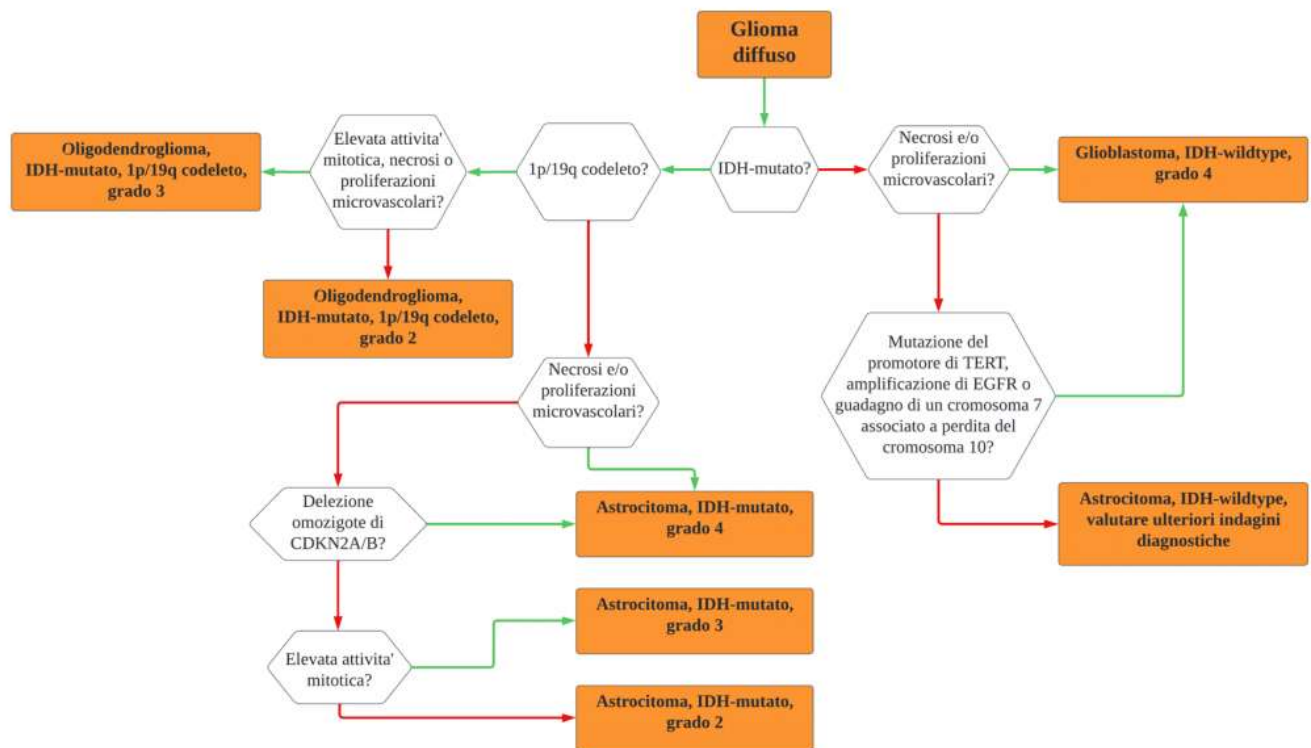


Figura 1: rappresentazione schematica della classificazione dei gliomi data dall'OMS nel 2021

Quindi è possibile affermare che i primi due tipi di tumori indicati possono avere un grado di malignità basso o intermedio mentre il glioblastoma ha un alto grado di malignità. (Antonelli & Poliani, 2022)

La classificazione dell'OMS suddivide i gliomi in quattro gradi in base alla loro aggressività:

- Grado 1: Tumori a crescita lenta e spesso circoscritti
- Grado 2: Tumori a crescita lenta ma con tendenza a infiltrarsi nel tessuto vicino e a evolvere in gradi superiori.
- Grado 3: Tumori anaplastici, mostrano segni di divisione cellulare attiva e sono più aggressivi.
- Grado 4: I più aggressivi (es. glioblastoma), caratterizzati da rapida crescita e proliferazione vascolare.

La diagnosi di gliomi diffusi fino alla quarta edizione rivista della classificazione dei tumori del SNC da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2016 si basava principalmente sulle caratteristiche istopatologiche. Successivamente nel 2021 l'OMS ha preso in considerazioni anche marcatori molecolari come isocitrato deidrogenasi (IDH) oltre alle caratteristiche istopatologiche. (Anand et al., 2021)

Per assegnare il grado più elevato in caso di tumori astrocitari diffusi IDH-wildtype, contesto in cui può essere diagnosticato il glioblastoma IDH-wildtype, è stato dimostrato come la presenza di uno o più dei tre parametri genetici sembra sufficiente. I parametri genetici di interesse sono mutazione del

promotore TERT, amplificazione del gene EGFR , guadagno combinato dell'intero cromosoma 7 e perdita dell'intero cromosoma 10 [+7/-10]. (Louis et al., 2021)

Oggi tutti i tumori diffusi caratterizzati da una mutazione di IDH sono considerati all'interno del gruppo degli astrocitomi IDH-mutanti che possono avere però un diverso grado in base alle caratteristiche biologiche, molecolari e istopatologiche. A fronte di questo la categoria “glioblastoma IDH-mutante” non costituisce più un'entità separata ma è compreso nel gruppo più ampio di astrocitomi IDH-mutanti. (Wen & Packer, 2021)

1.1.2 Gliomi primari e secondari e interazione con l'ECM

I gliomi sono tumori cerebrali primari che si ritiene si sviluppino da cellule staminali o progenitrici neurali portatrici di alterazioni genetiche che danno origine al tumore. (Weller et al., 2024)

I gliomi diffusi di tipo adulto sono i tumori maligni più comuni del sistema nervoso centrale; i gliomi di basso grado presentano tassi di sopravvivenza a 5 anni fino all'80% mentre i gliomi di alto grado hanno tassi di sopravvivenza a 5 anni inferiori al 5%. (Whitfield & Huse, 2022)

I gliomi di alto grado hanno una sopravvivenza complessiva scarsa a causa anche dell'instabilità alla chemioterapia. Inoltre le metastasi extracraniche sono estremamente rare, soprattutto nei casi in cui non vi è alcuna interruzione della barriera emato-encefalica. (Dev et al., 2024)

Esistono dimostrazioni scientifiche della probabilità di svilupparsi di metastasi extracraniche che si verificano nello 0.5% dei casi e che coinvolgono la diffusione leptomeningea alla colonna vertebrale. (Sun et al., 2019)

È possibile comunque evidenziare alcuni meccanismi che portano allo sviluppo di metastasi extracraniche. Sono particolarmente comuni in pazienti con precedenti interventi chirurgici invasivi o biopsie, che potrebbero creare un accesso iatrogeno alle strutture extracraniche. Inoltre più del 90% dei pazienti con metastasi extracraniche segnalati è stato sottoposto a craniotomia in precedenza, quindi la diffusione di cellule gliali attraverso il flusso sanguigno durante l'intervento chirurgico sembra essere l'accesso più probabile. La metastasi extracranica può verificarsi in alternativa attraverso la migrazione di cellule gliali nel liquido cerebrospinale tramite shunt o cavità peritoneale, o attraverso la semina diretta nei tessuti molli tramite difetti da craniotomia. Anche la presenza di un'infezione cronica della ferita e la resezione del tumore possono aumentare la probabilità di sviluppare metastasi extracraniche. (Kurdi et al., 2023)

Una fase essenziale della disseminazione delle cellule tumorali è l'intravasazione ovvero la fase chiave nella diffusione sistemica delle cellule tumorali dato che questo processo continua anche dopo la rimozione del tumore primario. In generale, in questo processo, le cellule tumorali non agiscono da sole ma interagiscono invece con la matrice extracellulare e le cellule normali circostanti che costituiscono il microambiente tumorale (TME). Una componente importante della TME sono i

macrofagi associati al tumore che hanno un ruolo nella regolazione della risposta immunitaria, dell'angiogenesi e della crescita tumorale è stato ben riconosciuto mentre è stata posta una minore attenzione al ruolo dei macrofagi nell'intravasazione e nella disseminazione delle cellule tumorali. (Borriello et al., 2020)

Tra la matrice extracellulare e le cellule residenti si instaura una comunicazione bilaterale mediante interazioni cellula-matrice e rimodellamento dell'ECM. I tumori sfruttano il rimodellamento dell'ECM per creare un microambiente che promuove la tumorigenesi e la metastasi; nello specifico le cellule tumorali e le cellule stromali associate al tumore depositano, modificano biochimicamente e biofisicamente e degradano l'ECM associata al tumore. Questi cambiamenti indotti dal tumore supportano la crescita tumorale, aumentano la migrazione delle cellule tumorali e rimodellano l'ECM in organi distanti per consentire la progressione metastatica. (Winkler et al., 2020)

1.2 Il glioblastoma

Il glioblastoma (GB) inizialmente era classificato come "glioblastoma multiforme", dove "multiforme" si riferiva alle caratteristiche istopatologiche altamente variabili. Nella quarta edizione rivista (2016) della classificazione OMS, il termine "multiforme" è stato rimosso e questi tumori sono stati classificati semplicemente come "glioblastoma". (Agarwal et al., 2024)

Il tumore maligno cerebrale e del SNC più comune è il glioblastoma con una frequenza del 14,3% di tutti i tumori e del 49,1% dei tumori maligni; inoltre ha anche una maggiore frequenza nei maschi piuttosto che nelle femmine. (Ostrom et al., 2021)

Secondo la classificazione OMS 2021, il glioblastoma è definito come un glioma diffuso di tipo adulto, IDH-wildtype e di grado 4. Questa categoria integra criteri molecolari e istologici specifici, riflettendo accuratamente l'elevata aggressività e il profilo biologico e clinico del tumore. (Louis et al., 2021)

Il glioblastoma è caratterizzato da rapida proliferazione, infiltrazione diffusa nel tessuto cerebrale circostante, alto grado di eterogeneità genetica e resistenza ai trattamenti terapeutici standard. Finora, il GB è rimasto associato a un decorso clinico estremamente aggressivo infatti solo il 4,7% dei pazienti sopravvive 5 anni dalla diagnosi. (E. Roda & Bottone, 2022; Sipos et al., 2025)

Il glioblastoma può essere classificato in glioblastomi classici e mesenchimali i quali sono distribuiti in modo più diffuso e localizzati più lontano dalla zona subventricolare (SVZ). Al contrario, i glioblastomi proneurali e neurali hanno maggiori probabilità di essere localizzati in prossimità della SVZ. Con zona subventricolare si indica la regione adiacente alla parete laterale del ventricolo laterale; è un sito in cui si trovano le cellule staminali neurali (NSC) e i precursori degli astrociti nel cervello adulto. (Steed et al., 2016)

Questa particolare neoplasia del SNC può localizzarsi nel cervello, nel cervelletto, nel tronco encefalico o nel midollo spinale e ha origine dalle cellule gliali, in particolare dagli astrociti che possono essere classificati, in base alle loro caratteristiche istologiche, in gradi che vanno da I a IV dove il grado più elevato corrisponde al GB. Più nello specifico si ritiene che le aree più frequentemente coinvolte in caso di glioblastoma siano i lobi frontali, temporali e la regione infratentoriale. Inoltre è importante considerare che la localizzazione del tumore è un fattore importante per comprendere l'aggressività del tumore e il suo impatto sulla sopravvivenza del paziente. (Valenzuela-Fuenzalida et al., 2024)

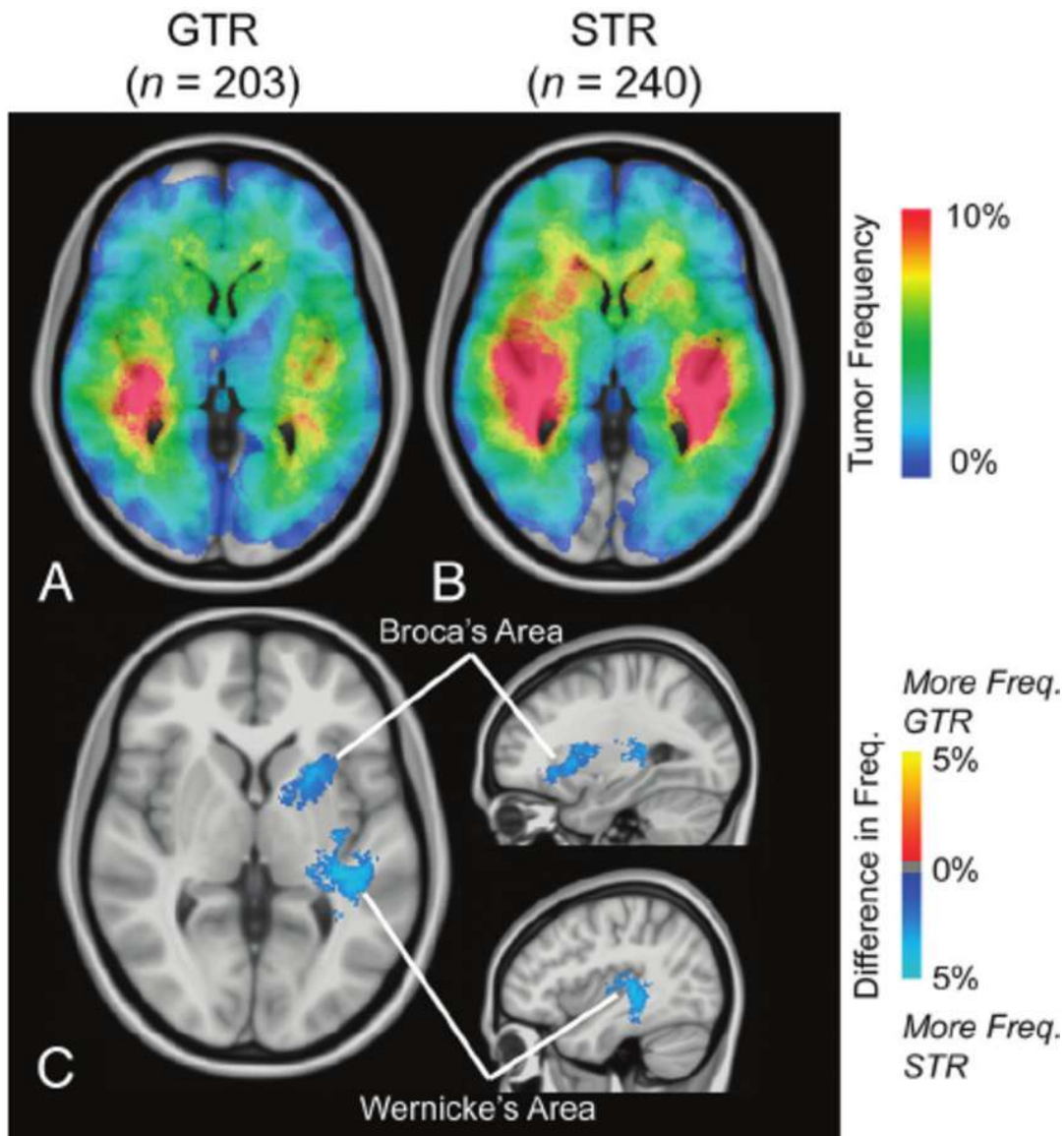


Figura 2: localizzazione del glioblastoma nel cervello (Lee et al., 2013)

Bisogna anche evidenziare come il tessuto cerebrale sano e i confini del tumore non possano essere separati, né a occhio nudo né con la microscopia chirurgica standard e questo rende difficile la massima rimozione sicura. (Seker-Polat et al., 2022)

La maggior parte dei sintomi del glioblastoma deriva dall'aumento della pressione intracranica (ICP), che è anche la principale causa di morte. (Lipková et al., 2022)

Le metastasi extracraniche del glioblastoma sono rare, soprattutto le metastasi multisito senza recidiva intracranica; a questo proposito si può evidenziare come queste metastasi hanno un'incidenza che varia tra lo 0.4% e il 2.0%. Il sito primario più comune di GB con metastasi extracraniche è il lobo temporale e i suoi siti metastatici includono polmoni, pleura, linfonodi, fegato, cute, cuoio capelluto, ghiandola parotide, milza, pancreas, mesentere intestinale, peritoneo, spazio epidurale e ossa. È frequente anche la diffusione alle meningi o al midollo spinale tramite il liquido cerebrospinale (LCS). (Liu et al., 2020)

Nonostante il trattamento multimodale, la sopravvivenza mediana è di 15-16 mesi e il tasso di sopravvivenza a 5 anni è del 5% circa. Inoltre i pazienti affetti da glioblastoma primario o secondario hanno una frequenza di recidiva molto alta. (Alves et al., 2021; Fekete et al., 2023)

Negli adulti, il rischio di sviluppare un GB aumenta con l'età, con un'età media alla diagnosi di 64 anni ed è stato dimostrato anche come i maschi hanno un rischio maggiore e tassi di sopravvivenza peggiori rispetto alle femmine. (Dmukauskas et al., 2024)

Prendendo in considerazione il fatto che i pazienti maschi mostrano uno svantaggio in termini di sopravvivenza rispetto alle pazienti femmine si ritiene che gli ormoni steroidei gonadici, in particolare il testosterone, potrebbero avere un ruolo nello sviluppo del tumore attraverso l'interazione con il recettore degli androgeni (AR), promuovendo la proliferazione cellulare e la progressione del tumore. Un'altra spiegazione per la maggiore incidenza del GB negli uomini, così come per la loro prognosi peggiore, è il ruolo protettivo dell'estradiolo (E2) nella crescita e progressione del glioma. Studi recenti hanno evidenziato che il progesterone (P4) è in grado di stimolare la crescita delle cellule staminali del GB, così come l'infiltrazione e la migrazione degli astrociti.

Le differenze di genere nell'incidenza e nella prognosi del GB non sono dovute esclusivamente a fattori ormonali, ma coinvolgono anche il contributo dei cromosomi sessuali. La presenza di due cromosomi X nelle femmine offre un livello di complessità genetica, poiché alcuni geni sul secondo cromosoma X sfuggono all'inattivazione dell'X, fornendo potenzialmente un effetto protettivo contro lo sviluppo del tumore. Nei maschi, il cromosoma Y è implicato anche nella biologia del cancro, poiché trasporta geni che svolgono un ruolo nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi. La perdita di porzioni del cromosoma Y è stata associata a una maggiore suscettibilità al cancro e a una progressione tumorale aggressiva.

Le differenze nella composizione cromosomica e negli ormoni sessuali tra uomini e donne portano a variazioni nelle risposte immunitarie, con le donne che generalmente presentano risposte immunitarie antitumorali più vigorose rispetto agli uomini. (Rossi et al., 2024)

A livello cellulare, alcuni processi tumorigenici sono stati associati allo sviluppo e alla progressione dei GB. Questi eventi intracellulari sono la perdita del controllo del ciclo cellulare, la sovraespressione dei fattori di crescita, l'angiogenesi, l'invasione e la migrazione, l'instabilità genetica e il disturbo dell'apoptosi. (Esemen et al., 2022)

Studi biochimici e genetici hanno identificato i principali regolatori molecolari della transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, che determinano la divisione cellulare e la cui deregolazione è alla base dello sviluppo del glioblastoma. (Figura) (Rubin et al., 2026)

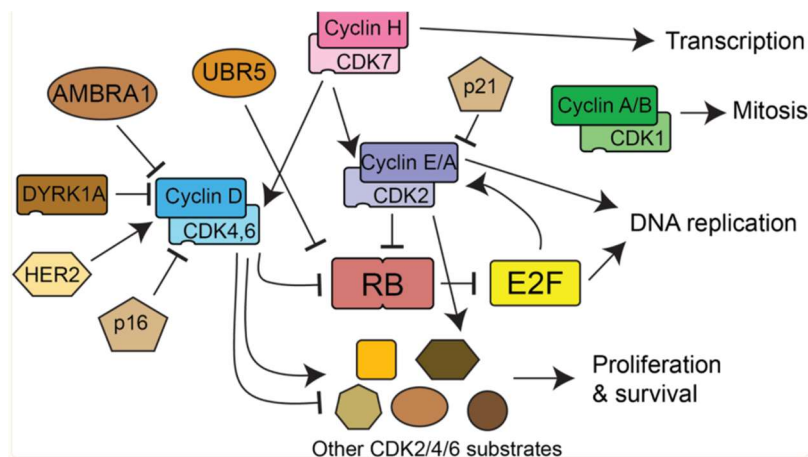


Figura 3: rappresentazione schematica dei principali regolatori della progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S (Rubin et al., 2026)

Circa il 90% dei casi di GB sono wild-type IDH-1/IDH-2 e mostrano spesso cambiamenti molecolari come l'amplificazione di EGFR e perdite del cromosoma 10. Sono presenti mutazioni significative anche a livello dei geni PTEN, TP53, della subunità catalitica alfa della fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato 3-chinasi (PIK3CA), della subunità regolatrice 1 della fosfoinositide-3-chinasi (PIK3R1), della neurofibromatosi 1 (NF1), della proteina del retinoblastoma 1 (RB1), IDH-1 e del recettore alfa del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFRA). (Aslan et al., 2022)

I fattori di rischio noti per il glioblastoma sono le radiazioni ionizzanti, la sindrome di Li-Fraumeni, la neurofibromatosi di tipo I e la sindrome di Turcot. Questi fattori di rischio spesso sono associati a diversi profili di mutazioni oncogeniche. (C. J. Smith et al., 2024)

È stato evidenziato come una storia allergica può essere associata a un ridotto rischio di tumore cerebrale. Inoltre, il rischio di glioma è negativamente associato all'asma e all'eczema. (Pan et al., 2025)

1.2.1 Caratteristiche istopatologiche del glioblastoma

La caratteristica morfologica distintiva del glioblastoma è la sua eterogeneità ed è stato dimostrato che è una ragione importante per cui questa neoplasia aggressiva è così resistente alla terapia. La sua

intrinseca eterogeneità intratumorale, caratterizzata dalla presenza di popolazioni di cellule tumorali differenziate clonali e subclonali, cellule staminali del glioma e componenti del microambiente tumorale, che influenzano molteplici funzioni cellulari distintive del cancro. L'"eterogeneità tumorale" comprende solitamente sia l'eterogeneità intertumorale (differenze a livello di popolazione) sia l'eterogeneità intratumorale (differenze all'interno dei singoli tumori). L'eterogeneità tumorale può essere valutata in un singolo momento (eterogeneità spaziale) o lungo l'evoluzione clinica del GB (eterogeneità longitudinale).

Sulla base delle differenti caratteristiche intratumorali e intertumorali il GB può essere classificato in otto *cluster*, a loro volta suddivisi in cinque gruppi più ampi di rilevanza fisiopatologica, che riflettono i sottotipi intertumorali. (Becker et al., 2021; Bergmann et al., 2020)

In generale le principali caratteristiche istopatologiche del glioblastoma sono la proliferazione microvascolare, la necrosi e la sopravvivenza globale. (Foltyn-Dumitru et al., 2025)

Questo tipo di neoplasia è caratterizzata anche da una bassa infiltrazione linfocitaria e un'elevata abbondanza di sottotipi mieloidi che, insieme, creano un microambiente immunosoppressivo altamente protumorale. Inoltre, le cellule di GB eterogenee infiltrano il tessuto cerebrale adiacente, rimodellando il microambiente neurale per favorire l'accoppiamento elettrochimico del tumore con i neuroni e l'accoppiamento metabolico con gli astrociti non neoplastici, stimolando così la crescita. (Read et al., 2024)

Morfologicamente, le cellule del glioblastoma variano tra forme poligonali e fusiformi, mostrando un citoplasma acidofilo e margini ben definiti.

I nuclei delle cellule neoplastiche del glioblastoma hanno forma allungata o ovale e presentano cromatina ipercromatica grossolanamente addensata con molteplici nucleoli distinti situati centralmente o pericentralmente.

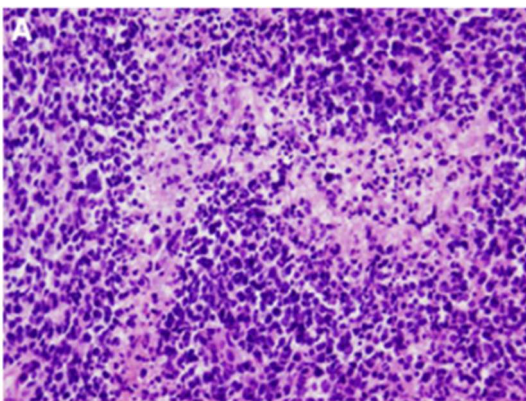


Figura 4: rappresentazione delle cellule di glioblastoma con nucleo ipercromatinico.

Le cellule del glioblastoma multiforme hanno un rapporto nucleo-citoplasma aumentato e mostrano pleomorfismo nucleare. Alcune cellule contengono inclusioni intranucleari. Possono essere presenti anche cellule binucleate e multinucleate, nonché linfociti, neutrofili, macrofagi e cellule necrotiche.

Alcune cellule assomigliano agli adipociti a causa della presenza di grandi vacuoli lipomatosi e possono costituire il 5-10% di tutte le cellule tumorali e persino l'80% in singoli casi. (Urbańska et al., 2014)

I glioblastomi sono tumori altamente vascolarizzati grazie al processo di angiogenesi che è la crescita di nuovi capillari a partire da vasi sanguigni preesistenti. L'angiogenesi è un processo complesso che coinvolge la proliferazione, la migrazione e la differenziazione delle cellule endoteliali vascolari (EC) sotto la stimolazione di segnali specifici. (Ahir et al., 2020)

Oltre al pattern vascolare caratterizzato da vasi a parete sottile e da segni di angiogenesi per gemmazione, il GB presenta una microvascolarizzazione atipica, formata da aggregati vascolari, ghirlande vascolari e corpi glomeruloidi. (Díaz-Flores et al., 2021)

Il glioblastoma è uno dei tipi di cancro con il rischio più elevato di tromboembolismo venoso (TEV). La TEV viene spesso osservata entro i primi 6 mesi dalla diagnosi di glioblastoma, ma rimane elevata per tutta la durata della malattia. (Kapteijn et al., 2024)

A livello istologico la necrosi è una delle caratteristiche che contraddistingue il glioblastoma ma ad oggi ancora non è chiaro se essa sia un effetto secondario o un fattore determinante della progressione. La necrosi di fatto induce una rapida espansione radiale del GB, accompagnata da una maggiore migrazione dei macrofagi associati al tumore (TAM) verso la zona necrotica e dalla comparsa di cellule staminali del glioma (GSC) nelle zone perinecrotiche. La necrosi può essere distinta, in caso di glioblastoma, in due principali forme ovvero la necrosi centrale e la necrosi pleiomorfa. La necrosi centrale è caratterizzata da ampie aree necrotiche, spesso centrali, causate da un'insufficienza vascolare cronica mentre il tumore cresce rapidamente. La necrosi pleiomorfa invece presenta piccoli focolai necrotici circondati da cellule tumorali ammassate; queste cellule si stanno attivamente allontanando dall'area ipossica. (J. Li et al., 2025)

È anche importante sottolineare che il GB è contraddistinto da strutture ipercellulari a forma di ghirlanda, le cosiddette pseudopalizzate, centrate attorno al sito di occlusione di un capillare. (Kumar et al., 2021)

Si ritiene che le pseudopalizzate si formino a seguito della fuoriuscita di cellule maligne dall'ambiente ipossico. Inoltre microglia e macrofagi associati al glioblastoma popolano abbondantemente le pseudopalizzate, mostrando una morfologia cinetica allungata attraverso le pseudopalizzate e orientandosi verso il focolaio necrotico. Nello specifico le cellule della microglia e i macrofagi associati al glioblastoma utilizzano le fibre delle cellule del glioma come segnale aptotattico per navigare lungo la struttura anisotropa delle pseudopalizzate e mostrano un'elevata attività fagocitica al confine necrotico delle pseudopalizzate. (Saavedra-López et al., 2020)

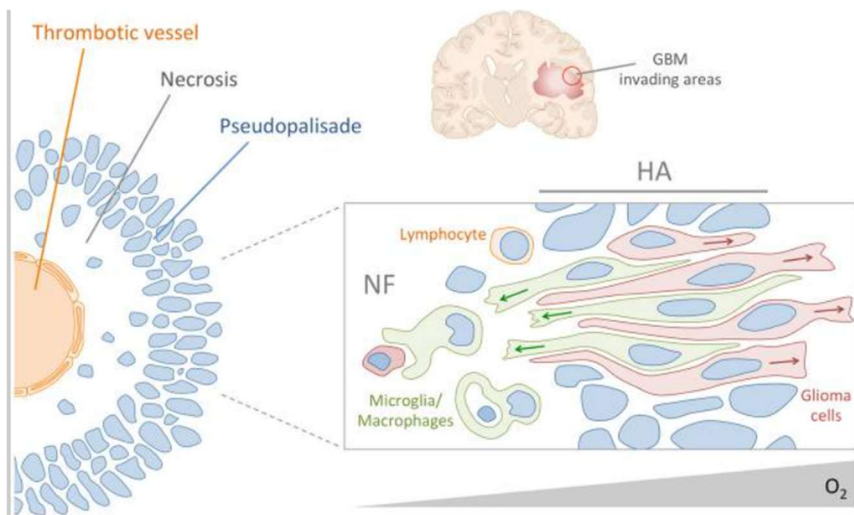


Figura5: rappresentazione della struttura a pseudopalisata (Saavedra-López et al., 2020)

Il glioblastoma è suddiviso in sottotipi istologici (hist-GB) e molecolari (mol-GB)(Guo et al., 2023) Nella classificazione WHO 2007-2016 vengono identificati come principali sottotipi definiti istologicamente scGB, GB a cellule granulari, GB epitelioidi, GB a cellule giganti e gliosarcoma. (Louis et al., 2016)

Successivamente nella nuova classificazione WHO 2021 alcuni di questi sottotipi istologici sono stati dissolti come entità autonome assorbendoli in categorie molecolari. Per esempio lo scGB non esiste più come entità distinta ma diviene un pattern morfologico del GB IDH-WT. (H. L. Smith et al., 2022)

A questo proposito è bene precisare che la classificazione OMS 2021 non include tutti i pattern morfologici come varianti ufficiali; gli unici sottotipi formalmente identificati restano il gliosarcoma e i tipi epitelioidi e a cellule giganti. (Torp et al., 2022)

Il glioblastoma a piccole cellule (scGB) è un raro sottotipo di glioblastoma primario, che in genere si comporta in modo più aggressivo rispetto al glioblastoma classico. È generalmente associato a una scarsa risposta al trattamento. A livello molecolare, in seguito alla nuova classificazione del 2021, gli scGB possono essere di tipo selvatico (WT) per l'isocitrato deidrogenasi (IDH) e presentare amplificazione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), che si ritiene contribuisca alla loro aggressività. (Zaman et al., 2022)

Una variante rara di glioblastoma è il glioblastoma a cellule granulari che è diffuso negli adulti di mezza età e anziani e quasi invariabilmente si sviluppa nel compartimento sopratentoriale, coinvolgendo prevalentemente i lobi frontali e temporali. (Atiya et al., 2026) L'esame istopatologico delle cellule di glioblastoma a cellule granulari ha rivelato lamine di grandi cellule poligonali con contorni cellulari ben definiti, abbondante citoplasma granulare eosinofilo PAS-positivo, nuclei irregolari, rotondi o ovoidali, in posizione eccentrica, con occasionali nucleoli prominenti. (Dutta et al., 2020)

Il glioblastoma epitelioidale ha una prevalenza complessiva della mutazione BRAF V600 ovvero una mutazione puntiforme (p.T1799A) nell'esone 15 del gene BRAF, che determina la sostituzione della valina con l'acido glutammico al codone 600. (Andrews et al., 2022)

Esiste anche il glioblastoma a cellule giganti che è una variante caratterizzata appunto da cellule giganti multinucleate; la regione caratterizzata da questo tipo di cellule tende ad essere più circoscritta e presenta una prognosi leggermente più favorevole. I glioblastomi a cellule giganti si sviluppano de novo con una breve storia preoperatoria ma contengono alterazioni genetiche simili a quelle osservate nei glioblastomi secondari. (PERAUD et al., 1997)

Il gliosarcoma è una rara variante istopatologica del glioblastoma e presenta una sopravvivenza globale simile, ma una risposta al trattamento peggiore e un profilo mutazionale differente rispetto al glioblastoma. Dal punto di vista istopatologico ha caratteristiche sia gliali che sarcomatose. Il gliosarcoma può insorgere de novo come gliosarcoma primario o svilupparsi come gliosarcoma secondario in seguito al trattamento di un tumore cerebrale preesistente. È stata evidenziata la presenza di mutazioni di BRAF, TP53, PTEN, NF1 e TERT con una maggiore frequenza nel gliosarcoma piuttosto che nel glioblastoma. (Chen et al., 2025)

1.2.2 Caratteristiche molecolari del glioblastoma

Il glioblastoma, oltre a presentare un'importante eterogeneità istologica, è caratterizzato anche da un complesso profilo molecolare.

Una delle principali caratteristiche molecolari del GB è la presenza di IDH wild type.

L'IDH catalizza la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato ad α -chetoglutarato (α -KG), generando così NADPH da NADP⁺. Al contrario, l'IDH mutato presente negli astrocitomi di alto grado catalizza la riduzione dell' α -KG a R (-)-2-idrossiglutarato (2-HG), che consuma NADPH; pertanto, i gliomi con mutazione dell'IDH presentano livelli elevati di 2-HG e una ridotta produzione di NADPH. L'aumento della produzione di 2-HG ha diverse conseguenze come il fatto che il 2-HG inibisce l'attività delle diossigenasi dipendenti da α -KG, tra cui le demetilasi degli istoni e la famiglia di idrossilasi della 5-metilcitosina ten-eleven translocation (TET), portando a un aumento della metilazione degli istoni e dell'ipermetilazione del DNA nelle cellule di glioma con mutazione IDH, denominato fenotipo di metilazione dell'isola CpG del glioma (gCIMP) a causa della conseguente ipermetilazione diffusa delle isole CpG. Il 2-HG inoltre sposta l' α -KG dalla sua attività come cofattore per altri enzimi, il che probabilmente contribuisce alle complesse conseguenze metaboliche della funzione mutante dell'IDH. Il 2-HG può compromettere la risposta locale delle cellule T antitumorali a causa dell'interferenza con l'attività trascrizionale del fattore nucleare delle cellule T attivate e la biosintesi delle poliammine e promuovere le crisi epilettiche tramite l'iperattivazione del bersaglio meccanicistico della rapamicina (mTOR) dipendente dal 2-HG. (Weller et al., 2024)

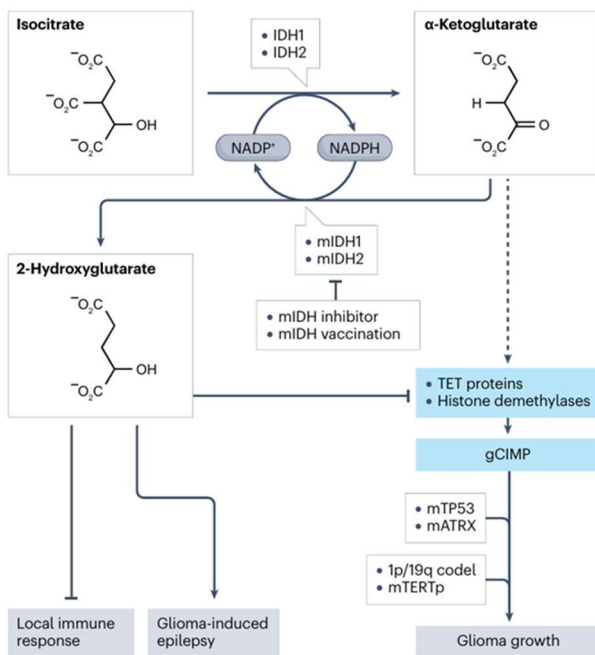


Figura 6: Conseguenze biochimiche e funzionali delle mutazioni IDH associate al glioma. (Weller et al., 2024)

È importante evidenziare come il glioblastoma IDH-wildtype mostra risultati sfavorevoli, mentre il l'astrocitoma IDH-mutante dimostra una migliore sopravvivenza, in particolare nei pazienti di sesso maschile e in quelli sottoposti a terapia multimodale. (Encarnación et al., 2025)

Nel caso di glioblastoma IDH-wildtype le principali implicazioni dal punto di vista molecolare sono mutazione del promotore della telomerasi trascrittasi inversa (TERT), amplificazione del gene del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e guadagno del cromosoma 7 e perdita del cromosoma 10. (Fernandes et al., 2023)

Altri pattern molecolari che sono interessati in caso di glioblastoma sono PIK-AKT-mTOR, p14ARF-MDM2-MDM4-p53 e la via del ciclo cellulare CDK4/6-CDKN2A/B-RB1. (Tomoszková et al., 2024)

Le principali alterazioni molecolari che interessano il glioblastoma sono le seguenti:

1. p53 pathway

Il gene TP53 codifica per un fattore di trascrizione che svolge un ruolo centrale in diverse vie metaboliche, tra cui il controllo del metabolismo, la risposta allo stress, la riparazione del DNA, l'arresto del ciclo cellulare, la senescenza e la morte cellulare programmata. Sono stati scoperti decine di geni bersaglio di p53 che svolgevano un ruolo nella soppressione tumorale. I bersagli di p53 possono essere bersagli canonici come CDKN1A (p21) e BBC3 (PUMA), che svolgono ruoli critici nell'arresto del ciclo cellulare e nella morte cellulare, ma non sono mutati nel cancro. Esistono anche geni bersagliati da p53 ma mutati nei tumori umani e che sembrano essere cruciali per la soppressione tumorale da parte di p53. È interessante notare che molti di questi geni codificano proteine che controllano ampie vie cellulari, come lo splicing e la degradazione proteica, e diversi di essi

codificano proteine che a loro volta regolano p53 tramite feedback. Tra questi figurano ZMAT3, GLS2, PADI4, ZBXW7, RFX7 e BTG2. (Indeglia & Murphy, 2024)

Inoltre p53 è in stretto contatto con MDM2 e MDM4 infatti in caso di glioblastoma a livello del pathway di p53 si ha un'amplificazione dei geni MDM2 e MDM4 che risultano quindi essere difettosi. (Yang et al., 2022) Nello specifico TP53 è deregolato nel 22% dei GB, mentre MDM2 e MDM4 sono deregolati rispettivamente nel 10% dei GB. (Y. Zhang et al., 2018)

È stato evidenziato come l'inattivazione di geni oncosoppressori come p53 può portare ad instabilità cromosomica caratteristica poi dei tumori maligni dato che si vanno ad interrompere diversi aspetti del ciclo cellulare e dei meccanismi di controllo del danno al DNA. (Andersson et al., 2023)

2. Rb pathway

La via di segnalazione Cdk-Rb-E2F controlla la progressione della transizione G1/S del ciclo cellulare. Nello specifico la Cdk a monte inibisce Rb per guidare la trascrizione dipendente da E2F e la progressione del ciclo cellulare. L'abolizione del punto di controllo G1/S è una caratteristica distintiva del cancro e si verifica tipicamente attraverso la perdita di Rb o attraverso l'iperattivazione delle Cdk. (Rubin et al., 2020)

Il gene RB1, che codifica per la proteina Rb, è tipicamente sottoregolato nel glioblastoma, contribuendo alla progressione del ciclo cellulare. (D. Roda et al., 2024)

In caso di GB i pazienti con mutazione RB1 presentavano alterazioni meno frequenti di CDKN2A/B e EGFR ma al contrario presentavano mutazioni più frequenti di TP53 e SETD2. È possibile anche l'amplificazione di CDK4 e CDK6 in caso di glioblastoma. (Dono et al., 2021; Kato et al., 2015)

Il pathway di p53 e di Rb sono strettamente correlati da CDKN2A. Il locus CDKN2A sulla banda cromosomica 9p21 codifica per due oncosoppressori, le proteine p14 ARF e p16 INK4A, entrambe in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare. La p14 ARF attiva la proteina p53 che svolge un ruolo importante nell'arresto della crescita, nella riparazione del DNA e nell'apoptosi. La p16 INK4A inibisce CDK4 e CDK6, che attivano la famiglia di proteine del retinoblastoma e bloccano la transizione dalla fase G1 alla fase S. (Appay et al., 2019)

Bisogna però anche considerare come le alterazioni nella sola via RB non sono sufficienti a guidare la formazione del tumore. Ad esempio, l'amplificazione dell'EGFR, che attiva la cascata di segnalazione pro-crescita PI3K, si verifica frequentemente in concomitanza con le delezioni di CDKN2A. (Pouyan et al., 2025)

3. RTK pathway

I recettori tirosin-chinasici (RTK) sono una classe di protein-chinasi che svolgono ruoli cruciali in diversi processi cellulari, tra cui la migrazione cellulare, la differenziazione morfologica, la crescita cellulare e l'angiogenesi. Inoltre le RTK influenzano l'attivazione dei fattori di trascrizione e la modificazione degli istoni attivando vie di segnalazione a valle come MAPK/ERK e PI3K/AKT, che

a loro volta causano proliferazione, resistenza, metastasi, angiogenesi e invasione dei tumori. Questa famiglia include EGFR, PDGFR, FGFR, MET, e VEGFR. (N. Zhang & Li, 2023) (

In caso di glioblastoma si può evidenziare una co-espressione di più RTK; EGFR e PDGFRA sono la coppia più comunemente co-attivata (fosforilata). A livello del DNA, la co-amplificazione dei loci EGFR e PDGFRA è stata osservata in circa il 5-7% dei GB. (Chakravarty et al., 2017)

Le vie di segnalazione PI3K/AKT/mTOR e RAF/MEK/ERK vengono comunemente attivate da mutazioni e traslocazioni cromosomiche in bersagli vitali. La via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR è disregolata in quasi tutti i tipi di neoplasie, con alterazioni dei componenti di questa via. Questa via ha anche un ruolo vitale nel promuovere l'apoptosi cellulare attraverso l'inibizione di geni correlati come p53, caspasi 3, recettore Fas (CD95) e recettore TNF (TNFR1). (Q. Li et al., 2022)

4. NF- κ B pathway

La segnalazione NF- κ B è cruciale per la proliferazione tumorale e la resistenza al trattamento nel GB. NF- κ B è parte integrante di varie funzioni biologiche, tra cui la proliferazione cellulare, l'infiammazione, la risposta immunitaria e l'apoptosi. L'attivazione di NF- κ B nel GB è dovuta ad anomalie genetiche e a una segnalazione anomala. NF- κ B è strutturalmente composto da omodimeri ed eterodimeri creati dai cinque costituenti della famiglia Rel: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/100), RelA (p65) e c-Rel. In assenza di stimolazione, NF- κ B rimane inattivo a causa della sua associazione con l'inibitore I κ B α ed è prevalentemente situato nel citoplasma. In seguito all'esposizione a stimoli come citochine o danni al DNA, le chinasi I κ B, vale a dire IKK α o IKK β , vengono attivate. Questa attivazione causa la fosforilazione di I κ B α , che poi subisce la degradazione attraverso una via proteosomica mediata dall'ubiquitina K48. L'NF- κ B liberato si trasloca successivamente nel nucleo, dove agisce come fattore di trascrizione per molti geni bersaglio a valle. Citochine come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), il ligando che induce l'apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale (TRAIL), il fattore di crescita epidermico (EGF) e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), insieme a sostanze chimiche che danneggiano il DNA, possono attivare l'NF- κ B attraverso la via canonica. (Ramar et al., 2025)

5. Wnt pathway

La via di segnalazione Wnt, conservata a livello evolutivo, svolge un ruolo centrale nello sviluppo e nell'omeostasi dei tessuti adulti in diverse specie. Le proteine Wnt sono molecole di segnalazione secrete e modificate da lipidi che attivano le vie di segnalazione Wnt canoniche (dipendenti dalla β -catenina) e non canoniche (indipendenti dalla β -catenina). Comportamenti cellulari come la proliferazione, la differenziazione, la maturazione e la corretta specificazione dell'asse corporeo sono mediati dalla via canonica. La segnalazione Wnt si è affermata come un fattore importante nella biologia delle cellule staminali ed è noto per influenzare l'autorinnovamento delle cellule staminali in vari tessuti. La segnalazione Wnt è stata anche implicata nelle cellule tumorali che mostrano

proprietà simili a quelle delle cellule staminali. Le mutazioni dei membri della via di segnalazione Wnt nel cancro possono portare a una proliferazione cellulare incontrollata, alla transizione epitelio-mesenchimale e alle metastasi. (Yu et al., 2024)

La via di segnalazione canonica Wnt canonica è dipendente dalla β -catenina mentre le vie di segnalazione Wnt non canoniche possono essere la via non canonica Wnt/PCP e la via non canonica Wnt/Ca²⁺. (Qin et al., 2024)

La segnalazione, in tutte e tre le vie, viene avviata dal legame simultaneo del ligando WNT al dominio extracellulare ricco di cisteina (CRD) di un recettore Frizzled (FZD) e a un dominio extracellulare (ECD) del co-recettore LRP5 o LRP6. (Qian et al., 2024)

È importante evidenziare come in circa il 13% dei casi di glioblastoma siano presenti mutazioni APC con una frequenza di mutazione vicina al 14,5%. (Guan et al., 2020)

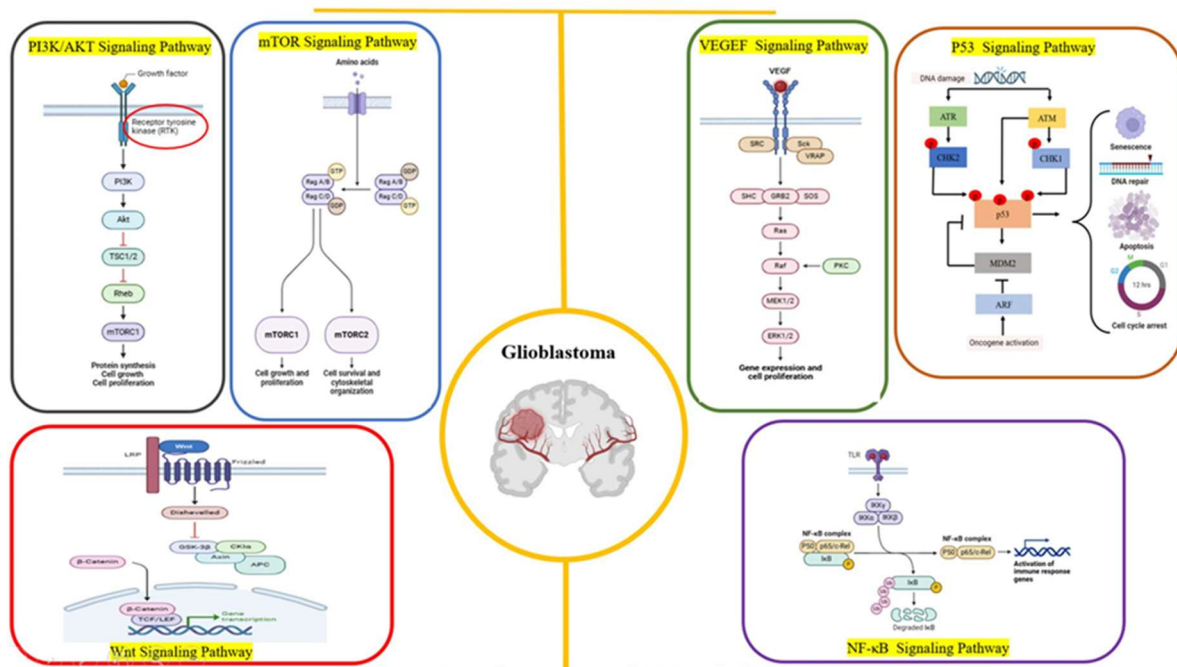


Figura 6: Vie di segnalazione nel glioblastoma (Pouyan et al., 2025)

1.2.3 Epigenetica e trascrittomica del glioblastoma

Le modifiche epigenetiche sono modifiche del genoma che influenzano l'espressione genica attraverso meccanismi che non alterano la sequenza del DNA e le modifiche degli istoni rappresentano una categoria particolarmente importante.

Le modificazioni istoniche hanno un ruolo cruciale nella progressione maligna e nella resistenza alla terapia del GB. Alcuni agenti che modificano gli istoni sono gli inibitori dell'istone deacetilasi e gli inibitori dell'istone metiltransferasi. (J. Zhang et al., 2025)

Nei pazienti affetti da glioblastoma è presente la metilazione del promotore genico di MGMT, NUPR1, NDRG2 e GLI1. Per questo lo stato di metilazione del promotore dell'enzima O6-metilguanina (O6-MeG)-DNA metiltransferasi (MGMT) è un biomarcatore prognostico e predittivo.

I pazienti con silenziamento di MGMT tramite ipermetilazione del DNA rispondono meglio al TMZ e hanno una sopravvivenza globale (OS) più lunga. (Gabr et al., 2026)

Mediante l'analisi delle alterazioni a livello della metilazione nel promotore è stata evidenziata la presenza di un'ipermetilazione concertata in un gran numero di loci, indicando l'esistenza di un fenotipo di metilazione delle isole CpG del glioma (G-CIMP). I tumori G-CIMP sono strettamente associati a mutazioni somatiche di IDH1 e i pazienti con tumori G-CIMP sono più giovani al momento della diagnosi e presentano un esito significativamente migliore. (Noushmehr et al., 2010)

Nei pazienti affetti da glioblastoma, l'eterogeneità della metilazione del DNA è stata associata a una maggiore infiltrazione di cellule immunitarie, a migliori tassi di sopravvivenza e a una progressione tumorale più lenta. E' stato quindi creato un punteggio di contributo all'eterogeneità della metilazione del DNA associato al tipo cellulare (CMHC) per esplorare l'impatto dei diversi tipi di cellule immunitarie sull'eterogeneità dei siti CpG (CpG ct) nei tessuti del glioblastoma. (Ma et al., 2024)

La ricerca scientifica ha ampiamente documentato negli anni la natura del glioblastoma, consolidando il consenso sulla sua profonda eterogeneità a livello trascrittomico.

Nel 2006 sono stati classificati i gliomi di alto grado in 3 sottotipi quali proneurale (PN), mesenchimale (MES) e proliferativo in base ai profili di espressione genica ottenuta dalla trascrittomica di diversi tessuti. Ancora oggi per la classificazione ci si basa su questo modello a tre sottotipi. (Xu et al., 2024)

Nell'ultimo decennio, la trascrittomica a singola cellula ha permesso la caratterizzazione molecolare delle singole cellule all'interno dei glioblastomi, fornendo informazioni prima irraggiungibili sulle caratteristiche genetiche e molecolari che guidano la tumorigenesi, la progressione della malattia e la resistenza alla terapia. (Yabo & Heiland, 2024)

1.3 La patogenesi del glioblastoma

Nella patogenesi del glioblastoma svolge un ruolo molto importante HSP90; nello specifico svolge una funzione cruciale nel rimodellamento metabolico e nella regolazione trascrizionale dei geni chiave coinvolti nella tumorigenesi e nella progressione del cancro. HSP90 influenza direttamente i processi metabolici regolando l'attività e la stabilità di vari enzimi metabolici. Inoltre, influenza indirettamente le reti metaboliche e le vie oncogeniche modulando le vie di segnalazione dipendenti da HSP90. (Virtuoso et al., 2024)

Nel GB, si ritiene che le alterazioni e l'aumento dell'attività di vie di segnalazione cruciali come Wnt, TGF- β , VEGF, EGFR, CDKN2A, NF- κ B e la via PI3K/AKT/mTOR svolgano un ruolo nella patogenesi della malattia e contribuiscano al comportamento aggressivo del tumore. Significative per la tumorigenesi di questa neoplasia sono le aberrazioni nella segnalazione di FGFR, comprese mutazioni e fusioni, che interrompono un equilibrio fisiologico. (Pouyan et al., 2025)

Molto importanti sono anche le mutazioni di PTEN (soppressore tumorale); principalmente si possono riscontrare mutazioni missenso, nonsense, di inserzione e di delezione che contribuiscono alla perdita di espressione e funzione di PTEN. (Dillon & Miller, 2014)

In caso di glioblastoma, molto frequentemente, si ha la perdita del soppressore tumorale PTEN associata all'attivazione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). Questo comporta una proliferazione aumentata, anche con livelli subottimali di fattori di crescita, e una maggiore migrazione e invasività. (L. Li et al., 2009)

P53 è un importante soppressore tumorale il cui pathway è deregolato in oltre l'80% dei pazienti con glioblastoma e in circa il 94% delle cellule derivate da GB. Anche il pathway di RB è deregolato in questa neoplasia portando all'elusione dei meccanismi di controllo del ciclo cellulare. (Sati & Parhar, 2021)

La via di segnalazione del fattore nucleare- κ B (NF- κ B) svolge anch'essa un ruolo cruciale nella patogenesi del GB, promuovendo la proliferazione, l'invasione, l'infiammazione, l'evasione immunitaria e la resistenza al trattamento. (Ramar et al., 2025)

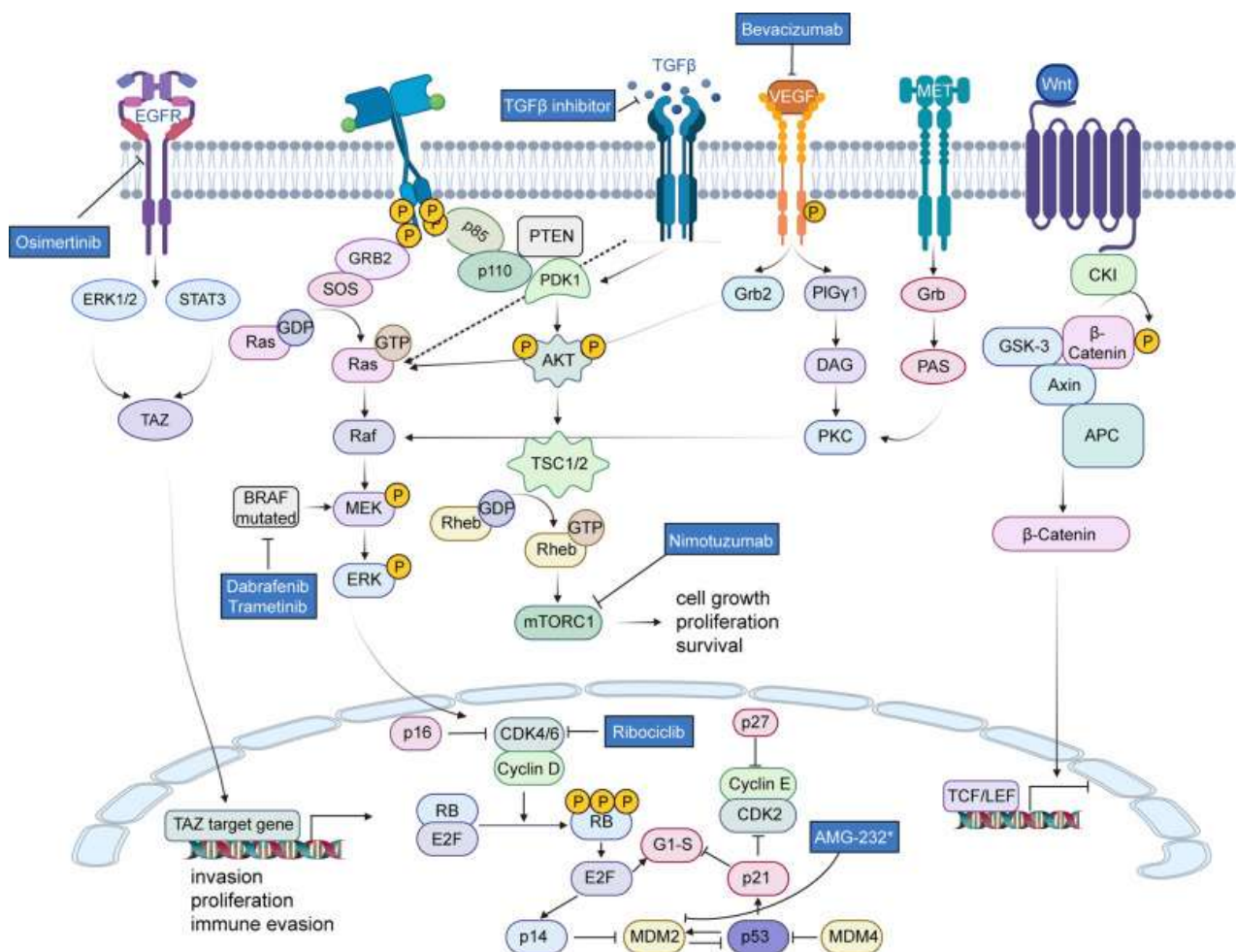


Figura 7: vie di segnalazione interessate nella patogenesi del glioblastoma (S. Li et al., 2023)

Il glioblastoma è un tumore che si sviluppa da un'origine di cellule staminali neurali non maligne comunemente denominate cellule staminali del glioma (GSCs). Le principali caratteristiche di queste cellule sono auto-rinnovamento e auto-replicazione. (Harland & Perks, 2025; Sloan et al., 2024) Inoltre, le GSC mostrano altre proprietà delle cellule tumorali, come l'angiogenesi, l'invasione e l'immunosoppressione, che promuovono la progressione della malattia e complicano il trattamento. La comprensione dei tratti distintivi delle GSC può offrire nuove strategie terapeutiche mirate a queste cellule per ottenere un trattamento efficace per questa malattia. (Valor & Hervás-Corpión, 2020)

Caratteristiche come l'ipossia, le nicchie vascolari e le interazioni immunitarie consentono di sostenere le GSC e di promuovere la progressione del GB. (Biserova & Strumfa, 2026)

È molto importante prendere in considerazione le vie di segnalazione e i recettori chiave responsabili del mantenimento delle GSC, tra cui le vie Notch, Wnt, SHH e della tirosin chinasi recettoriale (RTK). (Tang et al., 2021)

Le cellule tumorali di glioblastoma si infiltrano nel tessuto cerebrale adiacente dove si prevede che si verifichi la recidiva; questo è un aspetto molto importante per lo studio e la comprensione della patogenesi del GB. (Michalska-Foryszewska et al., 2024)

Le caratteristiche patologiche includono focolai necrotici come le pseudopalizate che si vengono a creare dalle cellule del GB che migrano dalle regioni ipossiche e creano fronti invasivi. (Chédeville et al., 2020)

Altro aspetto cruciale da considerare nella patogenesi di questa neoplasia è l'angiogenesi che è coinvolta nella sua crescita e sopravvivenza. (Nowacka et al., 2025a)

1.4 Sintomi e diagnosi del glioblastoma

Il quadro sintomatologico del glioblastoma è caratterizzato da una marcata eterogeneità, condizionata dal coinvolgimento funzionale della sede lesionale.

I sintomi dei tumori cerebrali maligni includono cefalea (50%), convulsioni (20-50%), deficit neurocognitivi (30-40%) e deficit neurologici focali (10-40%). Inoltre i pazienti possono anche sviluppare un aumento della pressione intracranica (PIC) e presentare nausea, vomito o affaticamento. (Schaff & Mellinghoff, 2023)

Le manifestazioni focali di più frequente riscontro includono l'emiparesi, i deficit del linguaggio, le alterazioni visive e i disturbi delle funzioni cognitive. (Omuro, 2013)

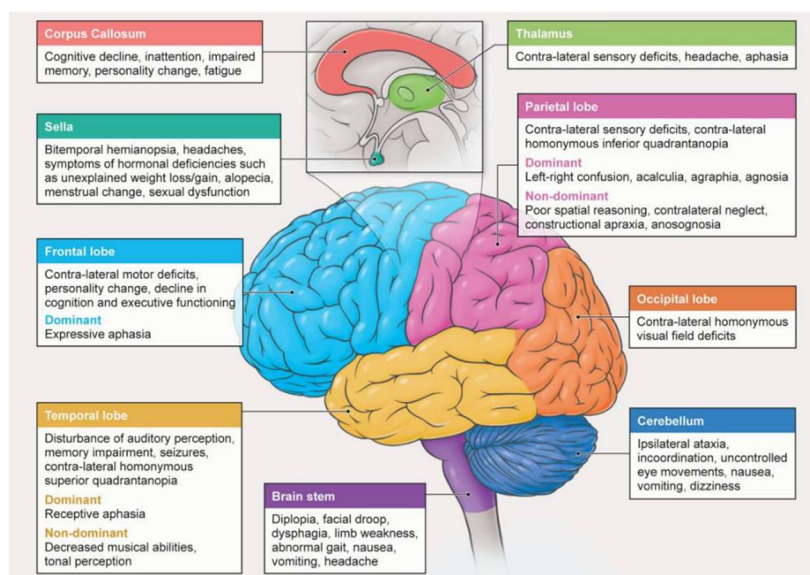


Figura 8: Sintomi correlati alla localizzazione del tumore (Schaff & Mellinghoff, 2023)

Per ottenere e confermare la diagnosi vengono spesso utilizzati campioni di tessuto ottenuti da biopsie tumorali per poi fare un'analisi di neuroimmagine ma questa è una procedura invasiva e complessa. Proprio per questo è stata poi sviluppata anche la biopsia liquida come metodo minimamente invasivo in grado di aiutare nella diagnosi, nella profilazione molecolare e nel monitoraggio del tumore, fornendo informazioni sul rischio, sulla prognosi e sulla recidiva nei pazienti oncologici. (Tataranu, 2025)

La spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) è una tecnica di *imaging* specializzata che fornisce informazioni sulla composizione chimica dei tessuti in base ai segnali emessi dagli atomi in diverse molecole. Nel contesto dei tumori, la MRS può rilevare marcatori metabolici specifici associati alle cellule tumorali. (Gue & Lakhani, 2024)

Le tecniche avanzate di risonanza magnetica offrono uno sguardo più approfondito sul GB rispetto a quanto possono rivelare le biopsie. L'integrazione dei dati della risonanza magnetica con i profili genetici (radiogenomica) ha il potenziale per la medicina di precisione basata sulla composizione genetica del tumore. Inoltre, la combinazione della risonanza magnetica con l'istologia è essenziale per comprendere la biologia alla base dei risultati dell'imaging. (Aleid et al., 2024)

1.5 Microambiente tumorale dl glioblastoma

A livello del glioblastoma è possibile identificare due macroregioni principali:

1) *Tumor core*: è di fatto il nucleo ipossico-necrotico che orchestra la riprogrammazione metabolica, il rimodellamento della matrice extracellulare e l'immunosoppressione per promuovere la progressione del tumore. (Bayona et al., 2026)

2) *Tumor periphery/ invasive edge*: è caratterizzato principalmente da cellule endoteliali, periciti, microglia attivata, astrociti reattivi e neuroni e ha un comportamento invasivo/infiltrativo causando la formazione di tumori secondari. (Read et al., 2024)

Il glioblastoma è un tumore cerebrale altamente eterogeneo e a questo proposito l'eterogeneità intratumorale e il microambiente tumorale (TME) contribuiscono alla resistenza terapeutica. (Wu et al., 2023) Alla luce di ciò, una comprensione ottimale delle molteplici fonti di eterogeneità nel glioblastoma e delle loro interrelazioni è un obiettivo cruciale per la neuro-oncologia, con ampie implicazioni in termini di efficacia terapeutica. (Nefel et al., 2019)

Nei dintorni della massa tumorale sono riconoscibili un varietà di tipi cellulari, tra questi le cellule staminali del glioblastoma (GSC), che possiedono potenziale di propagazione tumorale e mostrano una resistenza preferenziale alla radioterapia e alla chemioterapia.

Le GSC risiedono in nicchie specifiche ovvero microambienti protettivi all'interno del glioblastoma. (Hira et al., 2018) Per la definizione di nicchia, devono essere rispettate due condizioni che sono la presenza di GSC e il contatto diretto con le cellule endoteliali (EC). (Schiffer et al., 2018)

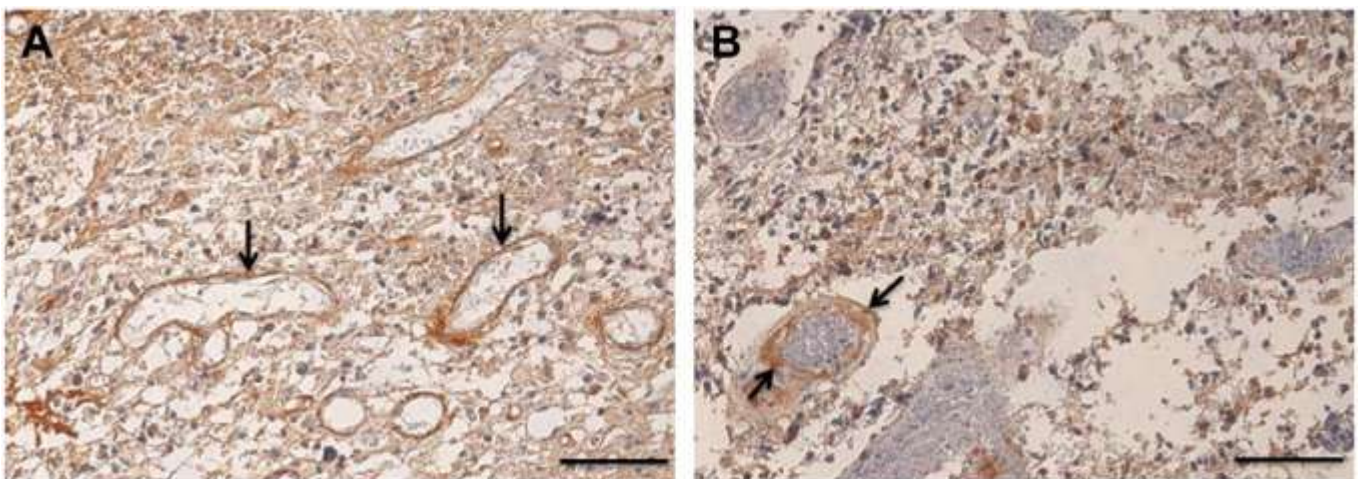


Figura 9: Immagini di nicchie di cellule staminali del glioma in tumori di glioblastoma umano colorate immunoistochimicamente per la tenascina-C.

All'interno del microambiente tumorale sono presenti anche cellule non tumorali, come gli astrociti non tumorali. In generale gli astrociti non tumorali sono le cellule gliali che costituiscono circa il 20-40% della massa cellulare totale nel cervello umano adulto. (Bugakova et al., 2024; Read et al., 2024) In caso di tumori al SNC, incluso il glioblastoma, essi entrano in uno stato reattivo e "isolano" il tessuto danneggiato da quello sano. Queste cellule hanno un importante impatto sulla proliferazione delle cellule GB e inoltre la presenza di astrociti è associata ad una minore sopravvivenza dei pazienti. Dal punto di vista del TME immunitario, è stato dimostrato che gli astrociti influenzano la nicchia immunitaria del GB attraverso il reclutamento, regolato da CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2)

e CSF1 (Colony Stimulating Factor 1), di macrofagi associati al tumore (TAM) e la promozione del loro fenotipo pro-tumorigenico. (Bugakova et al., 2024)

Un'altra componente cellulare non tumorale che caratterizza il GB sono i fibroblasti associati al cancro (CAF) i quali solitamente svolgono un ruolo immunosoppressivo; tuttavia, la capacità di queste cellule di rimodellare la matrice extracellulare (ECM) e di secernere citochine antinfiammatorie viene sfruttata dalle cellule tumorali. Possono anche partecipare alla preparazione di nicchie pro-metastatiche e promuovere l'espansione dei tumori.

In studi recenti è stato evidenziato come i CAF promuovono la chemioresistenza nei pazienti con GB mantenendo la popolazione di cellule staminali di tipo GB. (Bugakova et al., 2024)

Riguardo i fibroblasti associati al cancro è importante evidenziare come la comprensione dei geni che li caratterizzano possa portare ad importanti vantaggi dal punto di vista terapeutico. Per identificare i geni correlati ai CAF, espressi specificamente nel GB, sono stati sfruttati i dati provenienti da The Cancer Genome Atlas (TCGA) e dai dataset GB derivati da Gene Expression Omnibus (GEO); sono stati scoperti o due geni hub dei CAF, SERPINH1 (Serine Protease Inhibitor H1) e COL5A1 (Collagen Type V Alpha 1 Chain), che sono espressi nel GB. A tal proposito questi geni sono rilevanti marcatori dei CAF in caso di glioblastoma.

Analizzando i livelli proteici di entrambi i geni si è notato come sono più elevati nel tessuto peritumorale rispetto al tessuto cerebrale normale. Inoltre test di co-localizzazione hanno dimostrato come questi geni sono altamente espressi negli astrociti attivati che circondano il tumore. Infatti tramite co-cultura in vitro si è avvalorata l'idea che le cellule del GB possono reclutare e attivare gli astrociti alla periferia del tumore, inducendo la sovraespressione di SERPINH1 e COL5A1; questa attivazione avviene tramite la via di segnalazione AKT/mTOR. (J. Zhang et al., 2025)

Considerato che l'ambiente extratumorale del glioblastoma è altamente immunosoppressivo al suo interno presenta anche cellule del sistema immunitario come i macrofagi associati al tumore (TAM), le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC), le cellule dendritiche (DC) e i neutrofili associati al tumore (TAN). Sono presenti anche le cellule natural killer (NK), i linfociti citotossici CD8+, le cellule T helper CD4+ e le cellule B.

I macrofagi associati al tumore (TAM), ovvero i macrofagi residenti (microglia) e i macrofagi derivati dal midollo osseo (BMDM), sono le popolazioni cellulari non cancerose predominanti all'interno del GB, costituendo circa il 30-40% della massa cellulare totale. I macrofagi possono possedere attività sia pro-tumorali che anti-tumorali, rispettivamente i cosiddetti fenotipi M2 "freddi" e M1 "caldi"; il loro fenotipo "vero" in vivo è più vicino a uno spettro dinamico tra i fenotipi M0, M1 e M2 con numerosi stadi intermedi.

Le cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) sono un gruppo eterogeneo di progenitori mieloidi che producono molecole immunosoppressive come il fattore di crescita trasformante β

(TGF β) e l'interleuchina-10 (IL-10), con conseguente soppressione delle cellule effettrici T e B e delle cellule NK e accumulo di cellule T regolatorie (Treg).

Nel contesto del cancro, le DC possiedono attività proinfiammatoria (produzione di IFN I e presentazione dell'antigene) nonché attività protumorale (secrezione di IL10, TGF β e ligandi checkpoint che sopprimono l'attività delle cellule T CD8+).

I neutrofili sono i leucociti circolanti più numerosi e i neutrofili associati al tumore (TAN) associati al GB hanno un fenotipo immunosoppressivo delle cellule T e proangiogenico. Oggi si sta sviluppando un approccio che sfrutta i TAN come strumento terapeutico piuttosto che come bersaglio. Le cellule natural killer svolgono un ruolo piuttosto unico nell'immunità antitumorale dato che possono essere considerate portatrici di recettori chimerici per l'antigene per l'immunoterapia mirata. Inoltre le cellule NK possiedono sia attività citotossica contro le CSC sia promuovono la loro differenziazione; poiché le cellule GB differenziate sono più sensibili alla chemioterapia, la combinazione di terapia con cellule NK e chemioterapia potrebbe essere considerata una potenziale terapia del GB.

I linfociti T citotossici CD8+ si sono dimostrati uno strumento prezioso per l'immunoterapia del cancro. Attraverso il riconoscimento diretto degli antigeni tumore-specifici o associati al tumore/complessi MHC I sulla superficie delle cellule tumorali, le cellule T CD8+ citotossiche si attivano e iniziano a rilasciare granzimi e perforine che uccidono le cellule bersaglio.

Il ruolo essenziale delle cellule B è la produzione di anticorpi antigene-specifici. Durante la progressione del tumore, la presenza di neoantigeni promuove l'attivazione delle cellule B e la loro ulteriore differenziazione in plasmacellule, promuovendo la citotossicità cellulare anticorpo-dipendente e l'attivazione del complemento, la fagocitosi e la neutralizzazione dell'antigene. (Bugakova et al., 2024)

È importante evidenziare anche la presenza all'interno della matrice extracellulare di una componente non cellulare caratterizzata da livelli più elevati di collagene, fibronectina, laminina, acido ialuronico, tenascina-C e vitronectina. (Faisal et al., 2022)

Il collagene riveste un ruolo molto importante dato che contribuisce a stabilizzare la barriera emato-encefalica (BEE) supportando al contempo l'adesione, la migrazione e la sopravvivenza delle cellule gliali e neuronali. Inoltre esso consente il rilascio localizzato di farmaci, fattori di crescita e cellule staminali, creando così un ambiente favorevole alla riparazione delle strutture danneggiate del sistema nervoso centrale. (Guzdek et al., 2025)

Le fibre di fibronectina perdono la loro tensione in aree specifiche dei tumori cerebrali del glioblastoma, accumulandosi nel lume dei vasi sanguigni in proliferazione e nel parenchima adiacente agli aggregati di cellule immunitarie infiltranti. (Crestani et al., 2025)

La proteina FNDC3B (fibronectin type III domain containing 3B) è altamente espressa nel GB e ha effetto oncogeno sulla base dei database TCGA e GEO. I dati di sopravvivenza hanno indicato che i pazienti con GB con elevata espressione di FNDC3B avevano una prognosi peggiore rispetto a quelli con bassa espressione. (Kwon et al., 2023)

Diversi studi hanno evidenziato come il glioblastoma esprima la proteina della membrana basale vascolare laminina-411 ($\alpha4\beta1\gamma1$) mentre in caso di cervello normale sia espressa la proteina laminina-421 ($\alpha4\beta2\gamma1$). Questo suggerisce uno spostamento dell'isoforma della laminina (dalla catena $\beta2$ alla catena $\beta1$) durante la progressione del glioma. È quindi presente una correlazione tra i livelli di espressione della laminina-411 e il grado del glioma ma anche una correlazione tra i livelli di espressione della laminina-411 e i marcatori CSC tra cui Notch-1, Notch-3, CD133, Nestin e c-Myc. (Sun et al., 2019)

L'acido ialuronico (HA), a livello del SNC, partecipa alla corretta generazione, proliferazione e maturazione dei progenitori delle cellule staminali neurali (NSCP) durante lo sviluppo e la riparazione del cervello. La produzione di acido ialuronico da parte delle cellule del glioblastoma è superiore alla loro produzione nelle normali linee cellulari gliali, il che era associato a un tasso più elevato di proliferazione cellulare. L' HA ha un forte impatto sullo sviluppo e sulla progressione del tumore, favorendo la proliferazione cellulare, l'angiogenesi, la linfangiogenesi, la resistenza alla chemioterapia, l'evasione dell'apoptosi e l'invasione dei tessuti circostanti. Inoltre, l'accumulo di HA nell'ambiente tumorale è associato a una prognosi sfavorevole in diversi tipi di tumori. (Pibuel et al., 2021)

La tenascina-C (TN-C) è fortemente associata ai vasi sanguigni tumorali e la quantità di TN-C nei vasi sanguigni tumorali è correlata alla malignità del tumore poiché si trova in concentrazioni più elevate nei gliomi di alto grado rispetto ai gliomi di basso grado. Inoltre la TN-C stimola la proliferazione cellulare; una modalità di per indurre la proliferazione nelle cellule del glioma riguarda l'interazione tra TN-C e fibronectina. Bloccando l'adesione delle cellule alla fibronectina, si compromette l'attivazione del sindecano-4, il che porta alla proliferazione delle cellule a causa della prevenzione dell'adesione e della diffusione cellulare. I domini di splicing alternativo di TN-C svolgono un ruolo cruciale nel comportamento migratorio delle cellule di glioma. (Brösicke & Faissner, 2015)

La vitronectina (VTN) è emersa come il componente dell'ECM con il punteggio più alto nell'analisi proteomica di superficie cellulare del glioblastoma dell'adulto, evidenziando il suo potenziale ruolo nella progressione tumorale, nell'adesione e nella modulazione immunitaria. È stato dimostrato che VTN contribuisce alla sopravvivenza delle cellule tumorali, alla metastasi e alla resistenza all'apoptosi in vari tipi di cancro. (Day et al., 2025)

Un'altra componente importante che gioca un ruolo fondamentale nella matrice extracellulare del glioblastoma sono le integrine.

Le integrine grazie al fatto che si legano alle diverse componenti della TME attivano vie di segnalazione a valle, che regolano la migrazione, l'invasione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Inoltre la segnalazione mediata dalle integrine svolge un ruolo importante nello sviluppo e nell'omeostasi tissutale e la sua disregolazione; proprio per questo motivo le cellule tumorali e le cellule stromali associate al tumore spesso aumentano l'espressione di integrine. La segnalazione deregolata delle integrine è implicata nel guidare un fenotipo invasivo delle cellule tumorali e nella modulazione del microambiente tumorale per supportare l'angiogenesi, attivare gli enzimi che degradano la matrice, stimolare il traffico delle cellule immunitarie, sostenere le nicchie delle cellule staminali tumorali e regolare l'organotropismo delle cellule tumorali metastatiche. (Ellert-Miklaszewska et al., 2020)

Significativo è anche il ruolo delle vescicole extracellulari (EV) che supportano diverse caratteristiche distintive del cancro come la proliferazione tumorale, l'evasione della morte cellulare, l'induzione dell'angiogenesi, la modifica del metabolismo, l'invasione e la metastasi. (Yekula et al., 2020)

Nel contesto tumorale le EV vengo sfruttate per il trasferimento orizzontale di oncogeni o di piccoli acidi nucleici, al fine di influenzare sia le cellule tumorali che quelle non tumorali presenti nel microambiente tumorale. (Cela et al., 2024)

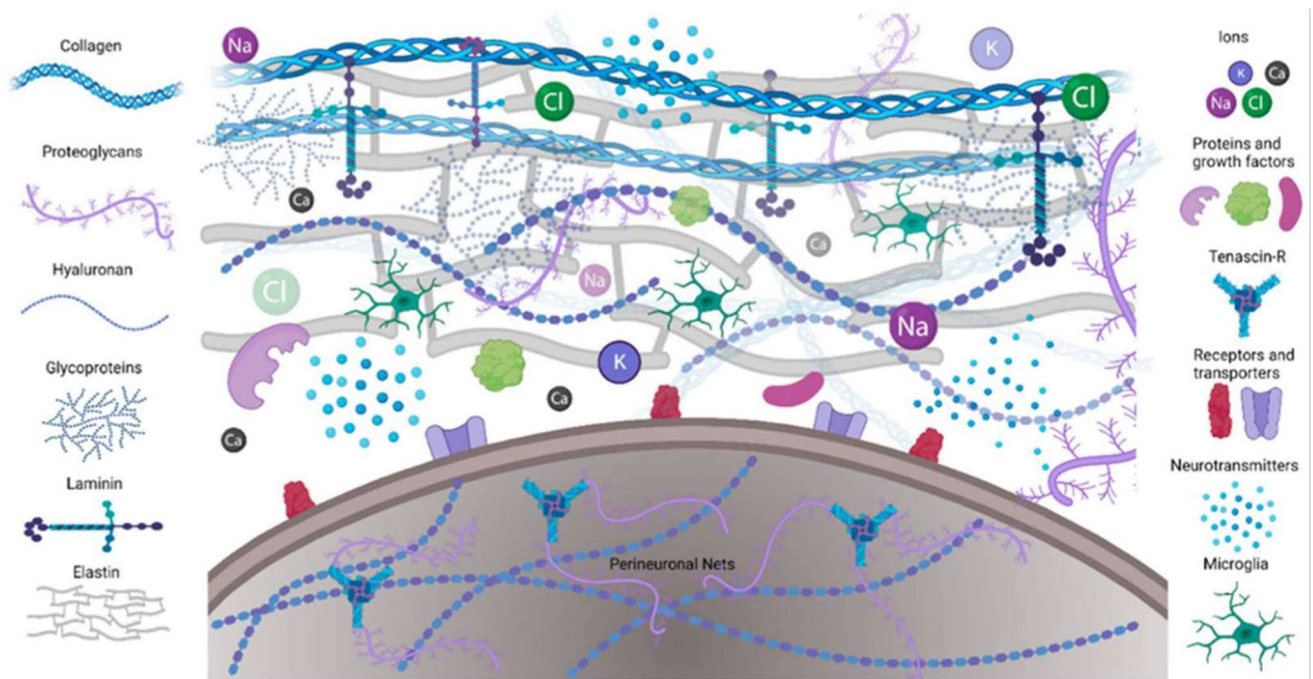


Figura 10: rappresentazione della matrice extracellulare del GB

1.6 Invasione e migrazione cellulare nel glioblastoma

L'invasione cellulare, in caso di glioblastoma, è il processo attraverso il quale le cellule tumorali si infiltrano attivamente nel tessuto cerebrale sano circostante degradando le barriere biologiche come la matrice extracellulare.

L'attività neurale, grazie alla segnalazione paracrina e le sinapsi glutamatergiche che si formano tra le cellule di glioblastoma (GBC), è spesso associata all'aumento della proliferazione e dell'invasione cellulare. (Venkataramani et al., 2022)

Nella maggioranza dei casi l'invasione delle cellule tumorali che caratterizzano il GB avviene nel tessuto cerebrale sano; per questo quindi è possibile considerare il processo di invasione alla base della recidiva di questo tipo di tumore. I moderni modelli di glioblastoma descrivono anche l'invasione delle cellule invasive di glioblastoma lungo i vasi sanguigni, i tratti nervosi e astrocitari e in modo diffuso attraverso la matrice extracellulare. (De Fazio et al., 2024; Venkataramani et al., 2022)

Studi in vivo hanno rilevato che le singole cellule di glioblastoma prive di connessioni con altre GBC e astrociti sono i principali motori dell'invasione diffusa del tumore cerebrale. Dopo la colonizzazione di altre aree cerebrali le cellule di GB invasive con stati neuronali iniziano a interconnettersi tra loro e con gli astrociti, passando a stati simili ad AC/MES, tipici delle cellule del tumore primario, per stabilire nuove reti cellulari come nel nucleo del tumore primario.

Nello specifico grazie a input sinaptici neuronali queste cellule sono in grado di guidare l'invasione cerebrale attraverso l'adattamento dei meccanismi neuronali cellulari. (Venkataramani et al., 2022)

Alla base del meccanismo di invasione si può evidenziare la presenza di due tipologie di proiezioni cellulare che caratterizzano le cellule di glioblastoma che sono i microtubi tumorali (TM) e i nanotubi di tunneling (TNT) che consentono interazioni tumore-tumore e neurone-tumore. È probabilmente anche con lo scambio di molecole attraverso i TNT che viene promossa l'invasione tumorale del glioblastoma.

L'invasione del GB può essere anche collettiva e in questo caso avviene in una direzione specifica e può portare ad un aumento della neurotossicità e delle convulsioni, che rappresentano uno dei primi sintomi. In questo contesto, la matrice extracellulare può funzionare come un ostacolo all'invasione cellulare o come un'impalcatura che supporta la crescita delle cellule invasive. Infatti, i componenti dell'ECM hanno un ruolo fondamentale nell'infiltrazione diffusa delle cellule tumorali. (De Fazio et al., 2024)

È stato evidenziato che le Metalloproteinasi della Matrice (MMP) nel contesto del glioblastoma facilitano la progressione del tumore degradando le barriere della matrice extracellulare (ECM), come è tipico del processo di invasione tumorale, consentendo così alle cellule tumorali di invadere il tessuto adiacente e diffondersi in siti distanti. Oltre alla degradazione dell'ECM, le MMP modulano

anche il microambiente tumorale attraverso il rilascio di fattori di crescita, citochine e chemiochine dall'ECM, promuovendo l'angiogenesi e migliorando l'evasione immunitaria. Nello specifico MMP-2 e MMP-9 sono state associate all'invasività del glioblastoma potendo così essere sfruttate come marcatore della capacità invasiva del tumore. (Aitchison et al., 2025)

La migrazione cellulare nel glioblastoma è la capacità delle cellule tumorali di spostarsi attraverso il tessuto cerebrale. A differenza dell'invasione la migrazione riguarda il movimento fisico della cellula lungo "binari" naturali, come i vasi sanguigni o le fibre della materia bianca.

Il fenotipo mesenchimale non polare che si sviluppa a seguito della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) promuove la migrazione delle cellule di glioblastoma. Inoltre anche l'aumento del legame della β -catenina alla caderina, così come dell' α -catenina alla caderina o alla β -catenina, promuove la migrazione delle cellule del glioma. (Barzegar Behrooz et al., 2022)

Nel glioblastoma ASCL1 e OLIG2 (fattori di trascrizione basic-helix-loop-helix) sono co-espressi dinamicamente e il legame di ASCL1 e OLIG2 ai rispettivi loci e ai geni bersaglio a valle determina i tipi cellulari e il grado di migrazione delle cellule tumorali. (Myers et al., 2024)

I processi di invasione e migrazione cellulare sono strettamente correlati alla condizione di ipossia che si manifesta durante la crescita del tumore, promuovendo la neoangiogenesi e l'infiammazione, che alimentano la proliferazione cellulare e l'invasione. (Frontiñán-Rubio et al., 2023)

Le cellule tumorali ipossiche, in cui c'è un apporto insufficiente di ossigeno, esprimono geni regolati dall'ipossia che controllano processi cruciali associati all'aggressività del tumore come l'angiogenesi, la degradazione della matrice extracellulare e il comportamento invasivo. Grazie all'utilizzo di inserti transwell è stato dimostrato sperimentalmente che le cellule esposte all'ipossia hanno quasi il doppio delle cellule invasive rispetto alle cellule coltivate in condizioni normossiche. (Joseph et al., 2015)

Anche condizioni di stress ossidativo nel microambiente tumorale che portano ad elevati livelli di ROS sono associate ad una maggiore proliferazione cellulare, migrazione e invasione delle cellule del glioblastoma grazie al fatto che viene favorita la transizione epitelio mesenchimale. (Nowacka et al., 2025)

Per quanto riguarda i processi di invasione e migrazione cellulare in caso di glioblastoma grazie ad analisi su pazienti affetti da questo tumore è stato evidenziato come i pazienti con assenza di cellule tumorali nel tessuto adiacente hanno avuto una sopravvivenza migliore rispetto ai pazienti con presenza di cellule nel tessuto adiacente. (Mangiola et al., 2008)

Altri studi clinici invece hanno sottolineato come nel 33% di questi studi i modelli di invasione più comuni nel GB sono i meccanismi vascolari mentre il secondo meccanismo di invasione più frequente è la transizione epitelio-mesenchimale. (Percuoco et al., 2024)

Il GB è altamente invasivo nel cervello mentre raramente si ha invasione e quindi la formazione di metastasi al di fuori del SNC. (Mourad et al., 2005)

A livello dei pazienti è molto difficile notare segni di invasione a causa di quello che viene definito paradosso del glioblastoma ovvero il fatto che è invisibile proprio perché è troppo invasivo.

È difficile vedere i suoi segni precisi perché l'infiltrazione è microscopica (a singola cellula) nel cervello ed è difficilmente rilevabile con la risonanza magnetica che ad oggi è il principale strumento di diagnostica per immagine utilizzato per monitorare la presenza del glioblastoma. (Tu et al., 2025)

Quindi la rapidità con cui il glioblastoma agisce può effettivamente precedere la comparsa di segni clinici o radiologici evidenti quindi di fatto il danno critico alle funzioni vitali avviene spesso prima che l'invasione possa essere mappata completamente o raggiunga stadi macroscopici in altre aree.

A questo proposito infatti anche in letteratura sono presenti pochi casi clinici che evidenziano segni di invasione in pazienti affetti da GB. Di seguito vengono riportati alcuni esempi.

Un esempio di caso clinico riguarda un paziente di 46 anni affetto da glioblastoma che dopo 2 anni dalla diagnosi ha sviluppato una recidiva e un tumore al polmone sinistro. (Achi et al., 2023)

Un ulteriore caso clinico riporta di una donna di 53 anni affetta da GB alla quale è stata eseguita una craniotomia d'urgenza con decompressione. Dopo 3 mesi di terapia con protoni è stata rilevata la presenza di una recidiva e quindi è stata eseguita una seconda craniectomia; oltre alla recidiva è stata successivamente anche evidenziata una metastasi spinale. (Hsu et al., 2020)

Ci sono evidenze cliniche di invasione anche a livello pediatrico; è stato riportato un caso di metastasi a partire da glioblastoma primario pediatrico, in una bambina di 10 anni, dal quale si sono sviluppate metastasi extracraniche in linfonodi cervicali, colonna vertebrale e polmoni. (Huang et al., 2024)

2 SCOPO DEL LAVORO

Il glioblastoma rappresenta il tumore primitivo del sistema nervoso centrale più aggressivo caratterizzato da elevata capacità infiltrativa e migratoria.

Tale peculiarità rende particolarmente complessa la gestione clinica della patologia, poiché la diffusione cellulare avviene in maniera diffusa e microscopica, spesso non rilevabile attraverso le attuali tecniche di imaging, come la risonanza magnetica, contribuendo in modo significativo alla recidiva e alla resistenza terapeutica.

Allo stesso tempo bisogna evidenziare come nei pazienti affetti da questo tipo di cancro sia difficile riscontrare frequentemente segni di invasione a causa della sua infiltrazione microscopica quasi mai visibili con la risonanza magnetica.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi si propone di investigare i meccanismi molecolari e funzionali alla base della motilità delle cellule di glioblastoma, con particolare attenzione all'interazione tra stress ossidativo, risposta infiammatoria e pathway coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella motilità cellulare.

Lo studio è stato condotto utilizzando la linea cellulare U251 come modello in vitro di glioblastoma umano, e ha previsto l'induzione controllata di stress ossidativo mediante H_2O_2 e di uno stato infiammatorio mediante LPS. Parallelamente, è stata valutata la risposta cellulare all'inibizione di pathway specifici attraverso l'impiego di Imatinib (target $PDGFR\alpha$) e di inibitori delle cathepsine B e L (CA074Me e inibitore di Cathepsin L), sia in condizioni basali sia in combinazione con gli stimoli ossidativi e infiammatori.

L'analisi della motilità cellulare ha incluso la valutazione funzionale dei processi di migrazione e invasione, l'osservazione di modificazioni morfologiche associate alla dinamica citoscheletrica e l'analisi dell'espressione di marcatori molecolari quali WFDC2, associato alla regolazione della migrazione cellulare, e MMP2 come effettore del rimodellamento della matrice extracellulare.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Coltura cellulare

La linea cellulare umana di glioblastoma U251 MG è stata mantenuta in condizioni standard di coltura, ovvero a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂. La linea cellulare è stata mantenuta in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10%, L-glutamina al 2%, piruvato di sodio all'1%, aminoacidi non essenziali all'1% e penicillina-streptomina (100 U/ml).

I reagenti impiegati sono stati acquistati da Celbio S.p.A ed Euroclone S.p.A (Pero, Milano, Italia).

Le cellule sono state coltivate in fiasca T75. Per il saggio di vitalità MTT le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a una densità di 5×10^3 cellule per pozzetto, per gli esperimenti su vetrino, a 6×10^5 cellule per pozzetto in piastre a 6 pozzetti, e per i saggi di motilità a 1×10^5 per ciascun inserto.

Dal punto di vista biologico, la linea U251 MG deriva da tumori isolati da pazienti adulti e ha tempi di raddoppio di circa 23 ore.

Sul piano molecolare, la linea U251 MG presenta alterazioni a carico di geni cruciali nella patogenesi del glioblastoma, tra cui mutazioni di PTEN, una mutazione del promotore di TERT e una mutazione di TP53).

3.1.1 Trattamenti

Al raggiungimento di una confluenza cellulare pari a circa l'80%, le colture sono state sottoposte ai rispettivi trattamenti per un periodo di 48 ore.

I trattamenti effettuati sulle due linee cellulari hanno previsto un'esposizione continua a LPS (Lipopolisaccaride, 0.1 µg/ml), utilizzato per indurre una condizione infiammatoria, H₂O₂ (30 µM), per indurre stress ossidativo, Imatinib (0.3 µM), CA074Me (0.3 µM) e Inibitore specifico di Catepsina L (0.05 µM, cat no 219433 Sigma-Aldrich) i quali vanno ad inibire PDGFR α , Catepsina-B e Catepsina-L.

Le concentrazioni riportate sono state definite sulla base di quanto riportato in precedenti studi o nel seguente.

3.2 Saggio MTT

La vitalità cellulare è stata stimata indirettamente mediante il saggio colorimetrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; Sigma-Aldrich, Milano, Italia]. Il principio del test risiede nella riduzione del sale tetrazolico giallo (MTT) in cristalli di formazano viola insolubili da

parte delle deidrogenasi mitocondriali. L'intensità del segnale colorimetrico così generato è direttamente proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 5×10^3 cellule/pozzetto in 100 μ L di terreno completo. Successivamente, sono state mantenute in incubatore per 24 ore a 37°C, in atmosfera controllata con il 5% di CO₂, al fine di favorirne l'adesione.

Successivamente, il terreno è stato aspirato e sostituito con quello contenente i trattamenti in studio, sia singoli sia in combinazione, alle concentrazioni prestabilite (si veda il paragrafo 3.1.1). È stata quindi eseguita un'incubazione di 48 ore.

Al termine del periodo di incubazione, il terreno esausto è stato sostituito in ogni pozzetto con 100 μ L di terreno addizionato con la soluzione di MTT (5 mg/mL in PBS, diluizione 1:10). Le piastre sono state incubate per 3 ore a 37 °C. Successivamente, il surnatante è stato rimosso e i cristalli di formazano prodotti sono stati solubilizzati in 100 μ L di DMSO, lasciando le piastre in agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente.

Infine, l'assorbanza è stata rilevata a 490 nm mediante il lettore di micropiastre ELx808TM (BioTek Instruments).

Le analisi sono state ripetute in triplicato tecnico e biologico e i risultati sono stati riportati come percentuale di vitalità rispetto il controllo senza trattamento (CTR, 100%).

3.3 Western blotting

La tecnica di western blotting ha consentito l'analisi delle proteine di interesse (PDGFR α , Catepsina B e Catepsina L) al fine di determinare la dose di Imatinib, CA074Me e inibitore della Catepsina L per andare a valutare la dose a cui si ha un'inibizione selettiva di ciascuna delle tre proteine prese in esame.

3.3.1 Preparazione dei lisati proteici

La raccolta del materiale cellulare è stata seguita da un lavaggio in PBS 1x; il campione è stato quindi centrifugato a 1000 rpm per 1 minuto per consentire la sedimentazione delle cellule e la formazione del pellet. Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso in PBS 1x. La procedura di lavaggio è stata ripetuta mediante una seconda centrifugazione a 1000 rpm, seguita dalla rimozione del surnatante ottenuto.

I pellet cellulari sono stati lisati a 4°C utilizzando un buffer preparato secondo la seguente ricetta: Tris-HCl (10 mM), MgCl₂ (2,5 mM), Nonidet (stock 5%, 1 μ L), DTT (Ditiotreitolo) 1mM, β -glicerofosfato (10 mM). Immediatamente prima dell'uso sono stati aggiunti PMSF (200 mM; 0,5 μ L $\times 10^6$ cellule), inibitore delle proteasi (20 μ L $\times 10^6$ cellule) e inibitore delle fosfatasi (1 μ L per 1 $\times 10^6$ cellule).

Il lisato è stato centrifugato a 6000 rpm per 1 minuto al fine di rimuovere i detriti cellulari; il surnatante chiarificato è stato quindi recuperato e utilizzato per le successive fasi sperimentali.

3.3.2 Quantificazione proteica e preparazione dei campioni

La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata mediante il metodo di Bradford per analisi spettrofotometrica. Per ciascuna cuvetta è stata allestita una miscela composta da 750 μ L di reagente Bradford, 22,5 μ L di H₂O e 2,5 μ L di campione; come riferimento di bianco è stata impiegata acqua distillata.

Al fine di garantire la comparabilità tra i campioni, la quantità di proteine totali caricata per la corsa elettroforetica è stata fissata a 30 μ g e mantenuta costante per tutte le condizioni sperimentali analizzate.

A ciascun campione è stato aggiunto il buffer di caricamento in rapporto 1:3 rispetto all'estratto proteico. Il buffer è stato preparato con la seguente composizione: Tris-HCl 195 mM, SDS 10x al 30%, glicerolo al 30%, DTT 300 mM e blu di bromofenolo allo 0,06%.

3.3.3 SDS-PAGE

La separazione delle proteine in base al peso molecolare è stata condotta mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) al 10%.

La preparazione del gel è stata eseguita secondo la ricetta di laboratorio, impiegando: H₂O distillata, soluzione Lower Tris 4x pH 8,8 (Trizma base al 1,5 M, Sodium-Dodecyl-Sulfate 10X e H₂O_d) per il running gel, soluzione Upper Tris 4x pH 6,8 (Trizma base al 1,5 M, Sodium Dodecyl-Sulfate 10x e H₂O_d) per lo stacking gel, acrilammide, SDS, TEMED e APS (0,15 g disciolti in 1 mL di H₂O distillata).

Prima di essere caricati sul gel, i campioni proteici sono stati denaturati termicamente a 90°C per 5 minuti al fine di garantire la completa denaturazione delle proteine, e successivamente centrifugati a 7000 rpm per 1 minuto per eliminare eventuali aggregati.

La corsa elettroforetica è stata condotta in tampone di corsa 10 $\times$ (3 g Trizma base; 14,4 g glicina; 10 mL SDS 10%; 90 mL H₂O distillata), applicando: 60 V per 30 min (fase di stacking) e 120 V per 1 h 30 min (fase di separazione).

3.3.4 Trasferimento su membrana e controllo del trasferimento

In seguito alla corsa elettroforetica (SDS-PAGE), è stato eseguito il trasferimento semiasciutto (semi-dry) delle proteine su membrana in PVDF da 0.2 μ m, utilizzando il sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) in funzione del peso molecolare dei target.

La membrana in PVDF è stata preliminarmente attivata in metanolo e successivamente equilibrata nel tampone di trasferimento. Parallelamente, anche i fogli di carta filtro sono stati immersi nel medesimo tampone. Si è quindi proceduto all'assemblaggio del *sandwich* di trasferimento, prestando particolare attenzione a garantire la perfetta aderenza tra gel e membrana e a eliminare eventuali bolle d'aria.

3.3.5 Controllo del trasferimento, blocco e incubazioni anticorpali

Il successo del trasferimento è stato valutato tramite colorazione con Ponceau S. Successivamente, la membrana è stata sezionata in più porzioni, ciascuna delle quali è stata processata separatamente per le successive fasi di saturazione (blocco) e di immunorivelazione con i rispettivi anticorpi.

Le membrane sono state quindi lavate in PBS-Tween 0,2% per 3 min e incubate in soluzione bloccante, Milk 5% in PBS-Tween 0,2 %, per 30 min.

Al termine della fase di saturazione, le membrane sono state sottoposte a due lavaggi in PBS-Tween 0.2% (da 5 minuti ciascuno) e successivamente incubate overnight a 4 °C con i rispettivi anticorpi primari. (*Tabella 1*)

Conclusa l'incubazione con il primario, le membrane sono state lavate tre volte per 5 minuti in PBS-Tween 0.2% e successivamente incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario appropriato. Nello specifico, è stato utilizzato un anticorpo anti-coniglio coniugato a perossidasi (Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP, Dako) diluito 1:2000.

Antigene	Caratteristiche dell'anticorpo	Diluizione in PBS
Catepsina-L	Thermo Fisher pAb Rb, BS-1508R	1:2000
Catepsina-B	Cell Signaling mAb Rb, CS-317185	1:2000
PDGFR α	AB clonal pAb Rb, A21103	1:4000
β -actina	GeneTex pAb Rb, GTX109639	1:4000

Tabella 1: Anticorpi primari utilizzati

Successivamente alla prima rivelazione, alcune membrane sono state trattate con un tampone di stripping (Glicina/HCl a pH 2) per 20 minuti al fine di rimuovere gli anticorpi legati. Dopo un'accurata fase di lavaggio, è stato così possibile riutilizzare le membrane per successive immunorivelazioni con altri anticorpi primari, seguendo la procedura descritta in precedenza.

3.3.6 Rivelazione (ECL) e acquisizione

La rilevazione delle bande è stata effettuata mediante chemiluminescenza potenziata (ECL, XLS142.0250 WESTAR ANTARES). La chemiluminescenza è stata indotta applicando sulla membrana la soluzione a base di luminolo (*Luminol/enhancer solution*) e il reagente a base di

perossido (*Peroxide solution*), miscelati in rapporto 1:1 secondo le istruzioni fornite dal produttore. Il segnale chemiluminescente è stato acquisito con sistema AZURE, utilizzando diversi tempi di esposizione. L'intensità delle bande è stata quantificata tramite analisi densitometrica utilizzando il software ImageJ (NIH, USA). I segnali dei target proteici sono stati successivamente normalizzati rispetto alla beta-actina, impiegata come controllo di caricamento. I valori così ottenuti sono stati infine utilizzati per il confronto statistico tra le diverse condizioni sperimentali.

3.4 Analisi di immunofluorescenza

La linea cellulare U251 è stata piastrata su vetrini in piastre a 6 pozzetti (6×10^5 cellule/vetrino) e coltivata fino a una confluenza di circa l'80%.

Al termine delle 48 ore di trattamenti, le cellule cresciute sui vetrini sono state sottoposte a fissazione. In particolare, è stata eseguita una fissazione in paraformaldeide al 4% per 20 minuti, seguita da un'incubazione in etanolo al 70% a -20 °C per 24 ore. Questa procedura consente di preservare la morfologia cellulare e prevenire l'autolisi, immobilizzando gli antigeni bersaglio e mantenendone l'antigenicità senza comprometterne l'architettura molecolare.

In seguito alla post-fissazione, i campioni sono stati reidratati in PBS-Tween 0.2% al fine di allontanare i residui di etanolo e rendere le cellule idonee alle successive fasi di immunofluorescenza. I vetrini sono stati poi sottoposti a blocco in PBS-Tween 0.2% e BSA 4% per 45 minuti, con l'obiettivo di prevenire il legame aspecifico degli anticorpi e abbattere il *background* di fluorescenza. All'interno della soluzione, il Tween agisce riducendo le interazioni non specifiche, mentre la BSA promuove la saturazione dei restanti siti di legame aspecifici.

Terminato il blocco, le cellule sono state incubate con gli anticorpi primari (*Tabella 2*) in camera umida a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo tre lavaggi in PBS per allontanare la frazione di anticorpo non legato, i campioni sono stati incubati per 45 minuti al buio con anticorpi secondari coniugati a fluorocromi (Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594; anti-topo o anti-coniglio; GeneTex), diluiti 1:200 in PBS-Tween 0.2%.

Antigene	Caratteristiche dell'anticorpo	Diluizione in PBS
MMP2	AB clonal pAb Rb, A6247	1:100
He4/WFDC2	AB clonal mAb Rb, A3276	1:100
α -tubulina	Cell Signalling mAb Ms, CS-3873S	1:200

Tabella 2: elenco degli anticorpi primari utilizzati per le reazioni di immunofluorescenza

Al termine dell'incubazione con i secondari, sono stati eseguiti tre lavaggi consecutivi in PBS della durata di 5 minuti ciascuno.

La controcolorazione nucleare è stata successivamente eseguita incubando i campioni per 5 minuti con Hoechst 33258 (0,1 µg/mL), un fluorocromo specifico per il DNA con emissione nello spettro del blu (eccitazione ~350 nm, emissione ~461 nm). Al termine dell'incubazione, i vetrini sono stati sottoposti a due lavaggi in PBS 1X da 5 minuti ciascuno.

In vista dell'analisi microscopica, i vetrini coprioggetto sono stati montati su vetrini portaoggetto utilizzando il Mowiol (Calbiochem), impiegato come mezzo di montaggio *anti-photobleaching* specifico per l'immunofluorescenza. I campioni sono stati quindi lasciati polimerizzare overnight al riparo dalla luce. I campioni sono stati mantenuti al buio fino all'acquisizione delle immagini.

Le immagini in immunofluorescenza sono state acquisite con un ingrandimento di 20X mediante un microscopio Olympus BX51, equipaggiato con fotocamera Olympus MagnaFire. Al fine di rendere confrontabili le diverse condizioni sperimentali, i parametri di acquisizione e i tempi di esposizione sono stati mantenuti rigorosamente costanti per ciascun marcatore. Per ogni vetrino sono stati campionati in modo casuale almeno cinque campi ottici differenti.

Nella linea cellulare U251 sono stati valutati i marcatori MMP2 (Matrix Metalloproteinase-2) e He4/WFDC2. Per ciascun target è stata acquisita in co-marcatura anche α -tubulina, utilizzata come riferimento interno. L'elaborazione e la quantificazione delle immagini sono state eseguite utilizzando il software ImageJ (NIH, USA).

Ai fini della quantificazione, i singoli canali sono stati considerati come immagini di intensità in scala di grigi. Per ogni cellula sono state tracciate manualmente le regioni di interesse (ROI) su entrambi i canali (marcatore d'interesse e α -tubulina), senza applicare soglie di ritaglio (threshold).

Per ogni ROI sono state registrate l'area e le misure di intensità di fluorescenza come Mean Gray Value (Mean), considerato come intensità media del segnale nella ROI (media dei valori di intensità dei pixel inclusi).

Aggiungere analisi numero e lunghezza protrusioni, fatte come per la forma della cellula ma sulle protrusioni.

3.5 Saggio di invasione e migrazione

I saggi di invasione e migrazione sono stati eseguiti su cellule precedentemente sottoposte a un pretrattamento della durata di 36 ore con LPS, H₂O₂, Imatinib, CA-074Me, Inibitore specifico di Catepsina L, LPS + Imatinib, LPS + CA-074Me, LPS + Inibitore specifico di Catepsina L, H₂O₂ + Imatinib, H₂O₂ + CA-074Me e H₂O₂ + Inibitore specifico di Catepsina L.

Per il saggio di invasione è stata utilizzata una *Basement Membrane Matrix* (DBA, Italia), lasciata scongelare overnight a 4 °C prima dell'utilizzo. La matrice è stata successivamente diluita in terreno MEM freddo privo di FBS fino a raggiungere una concentrazione finale di 1 mg/mL. Sono stati quindi

distribuiti 60 μ L di matrice in ciascun inserto Transwell (da 12 pozzetti) e lasciati polimerizzare mediante incubazione a 37 °C per 30 minuti.

Al termine del pretrattamento, le cellule sono state staccate mediante tripsina, contate utilizzando la camera di Burker e seminate negli inserti Transwell. Nella camera superiore (*upper chamber*) sono stati aggiunti 500 μ L di sospensione cellulare (1×10^5 cellule/pozzetto) in terreno completo contenente 0,5% FBS, lo specifico trattamento di stress (LPS o H₂O₂) e il relativo inibitore, mantenendo quindi le stesse condizioni sperimentali del pretrattamento. Nella camera inferiore (*lower chamber*) sono stati aggiunti 1 mL di terreno completo contenente 10% FBS come agente chemioattraente e il corrispondente inibitore.

Le cellule sono state incubate per 12 ore a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% CO₂. Al termine dell'incubazione, le cellule non migrate/non invasive presenti sulla superficie superiore della membrana sono state rimosse delicatamente mediante tampone di cotone, mentre quelle migrate o invasive presenti sulla superficie inferiore sono state fissate e colorate con cristal violetto per la successiva acquisizione delle immagini e quantificazione.

3.5.1 Colorazione con Cristal Violetto

Al termine degli esperimenti di migrazione e invasione, le cellule non migrate ed il terreno di coltura sono stati rimossi. Dopo aver delicatamente lavato le membrane dei Transwell con PBS, gli inserti sono stati trasferiti in nuovi pozzetti contenenti 600 μ L di soluzione di cristal violetto allo 0,5% in metanolo al 20% e incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, gli inserti sono stati lavati ripetutamente con acqua distillata per eliminare il colorante in eccesso.

Le membrane sono state quindi osservate e acquisite mediante microscopio ottico per la successiva analisi quantitativa.

3.5.2 Analisi dei dati del saggio di invasione e migrazione

L'analisi delle immagini è stata eseguita utilizzando il software ImageJ (Fiji). Per ogni camera di transwell sono stati analizzati 5 campi indipendenti per i quali è stata calcolata la densità cellulare espressa come percentuale di area occupata dalle cellule.

3.6 Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media $\pm$ SD. La distribuzione dei dati è stata valutata mediante i test di normalità D'Agostino & Pearson, Anderson–Darling, Shapiro–Wilk e Kolmogorov–Smirnov. La significatività delle differenze tra le condizioni sperimentali è stata valutata mediante ANOVA a una via con test post-hoc di Tukey quando i dati soddisfacevano i presupposti dei test parametrici; in caso contrario è stato utilizzato il test di Kruskal–Wallis. I livelli di significatività sono stati indicati

come: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Le analisi sono state condotte con GraphPad Prism v8.4.0.

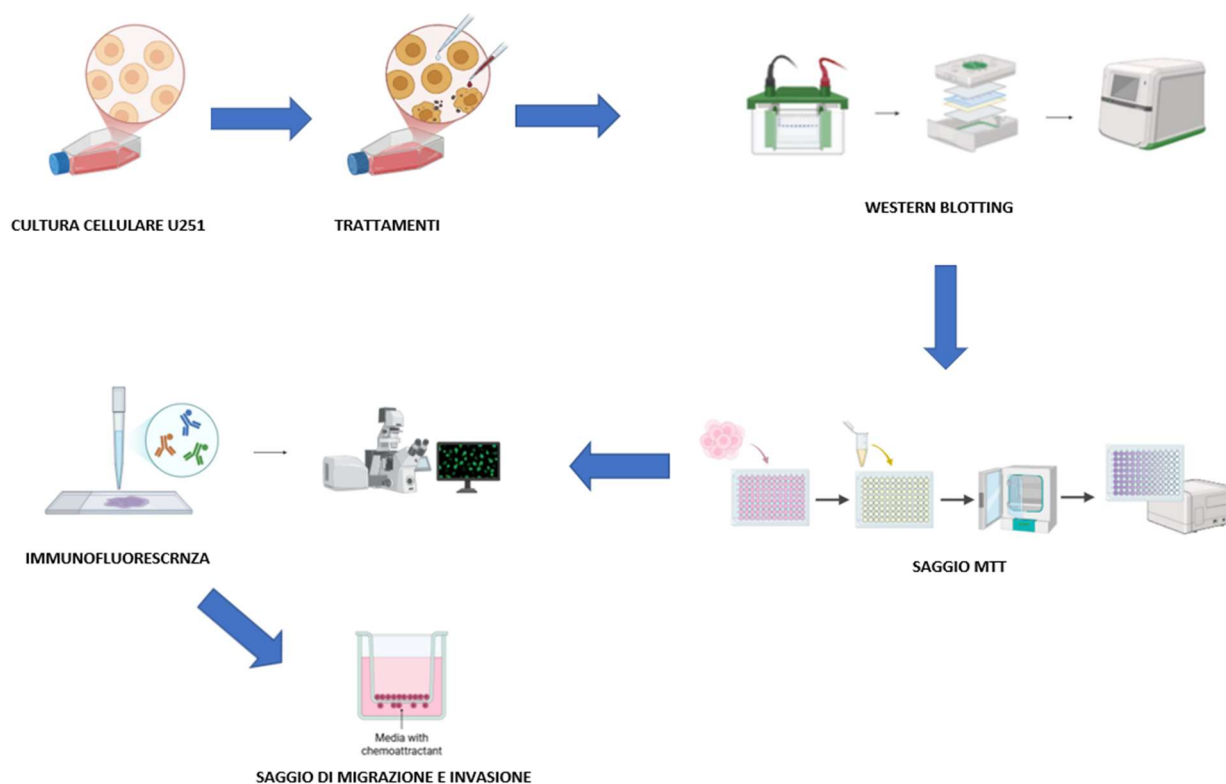


Figura 11: rappresentazione grafica del processo sperimentale (ottenuta con biorander)

4 RISULTATI

4.1 Analisi western blot per la selezione delle condizioni sperimentali

Per determinare la concentrazione di Imatinib necessaria a dimezzare l'espressione di PDGFR α , è stato eseguito un saggio Western blot. Sono stati quindi valutati i livelli proteici di PDGFR α , catepsina B (Cath B) e catepsina L (Cath L) in seguito a trattamento con 0.001-0.1 μ M di Imatinib.

L'analisi quantitativa ha evidenziato una marcata riduzione dell'espressione di PDGFR α già alle concentrazioni più basse. In particolare, i valori medi normalizzati rispetto al controllo mostrano una diminuzione progressiva, scendendo sotto il 50% nell'intervallo tra 0,156 e 0,312 μ M. A concentrazioni superiori, l'espressione della proteina rimane stabilmente ridotta, indicando il raggiungimento di un plateau di inibizione.

Al contrario, la catepsina B (Cath B) non ha evidenziato una chiara relazione dose-dipendente, mostrando forti oscillazioni e un'elevata variabilità tra i replicati biologici nell'intero intervallo di screening. La catepsina L (Cath L) ha invece mostrato un trend generale di up-regolazione rispetto al controllo, con picchi di espressione in corrispondenza delle concentrazioni intermedie di Imatinib.

Poiché l'obiettivo principale dello studio è identificare una concentrazione di Imatinib biologicamente efficace nel ridurre PDGFR α , i dati di espressione sono stati analizzati mediante un modello di regressione log-logistica a quattro parametri (4PL). Questo approccio, ampiamente utilizzato nello studio delle curve dose-risposta, permette di descrivere matematicamente la relazione tra concentrazione del farmaco ed effetto biologico, consentendo una stima accurata del parametro EC50, definito come la concentrazione che riduce del 50% il parametro osservato.

L'adattamento del modello ai dati sperimentali ha permesso di stimare un valore di EC50 nell'intervallo delle basse concentrazioni di Imatinib (0.159 μ M, valore preciso derivato dal modello), indicando che una modesta esposizione al farmaco è sufficiente per ottenere una sostanziale riduzione dell'espressione di PDGFR α .

Per quanto riguarda invece le successive fasi sperimentali è stata presa in considerazione una concentrazione di Imatinib di 0.3 μ M dato che consente il mantenimento di una riduzione del 50% di PDGFR α senza però modificare la concentrazione delle altre proteine.

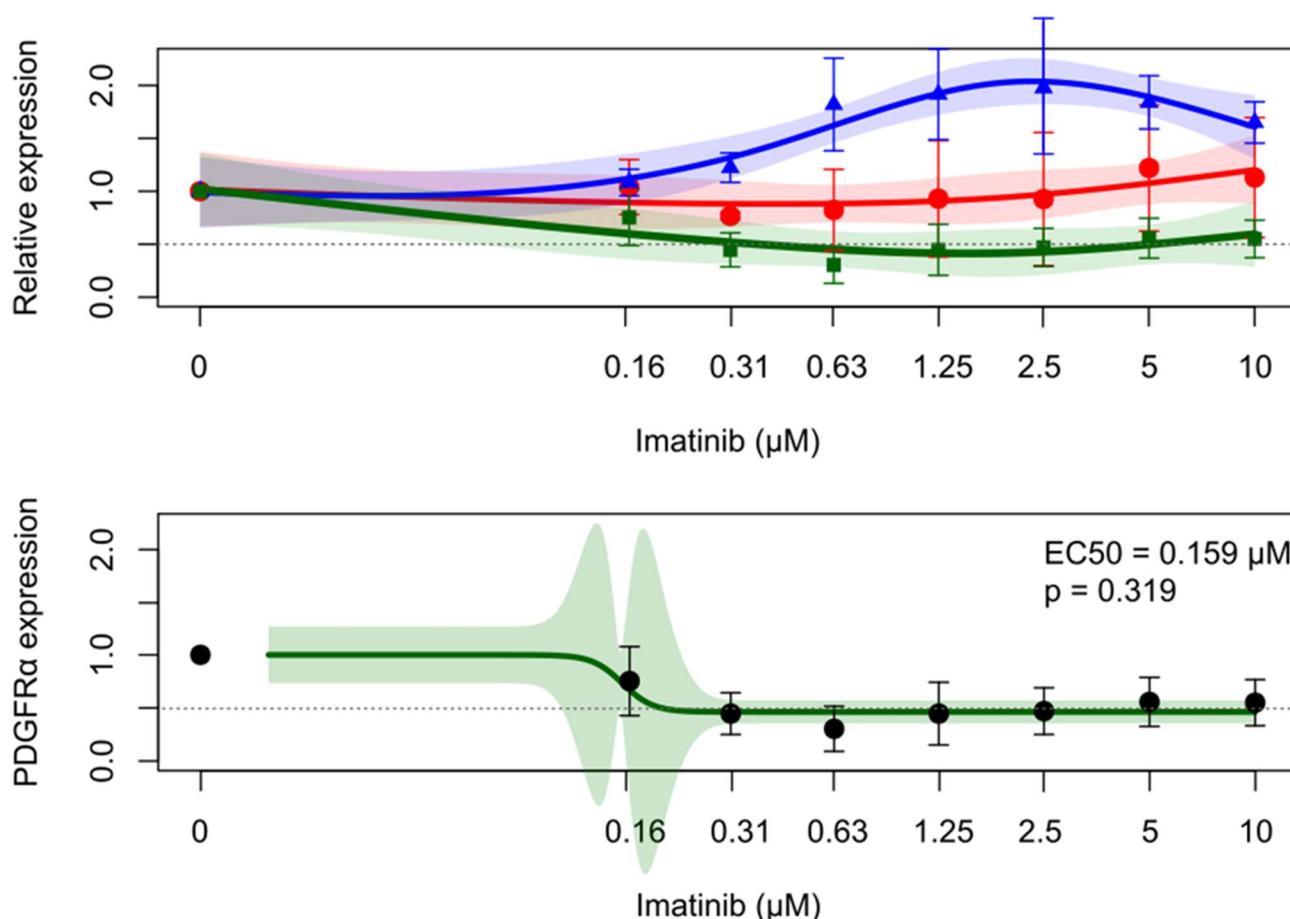


Figura 12: Analisi dose-risposta dell'espressione proteica dopo trattamento con Imatinib. Nel grafico in alto sono riportati i profili di espressione relativa di PDGFRα (linea verde), catepsina B (linea rossa) e catepsina L (linea blu) a concentrazioni crescenti di Imatinib (0–10 μM). Il grafico in basso rappresenta la modellizzazione della curva dose-risposta di PDGFRα mediante regressione log-logistica a quattro parametri (4PL).

Con un approccio analogo, è stata determinata la concentrazione di CA074Me necessaria a dimezzare l'espressione di catepsina B, valutando gli effetti di un'esposizione a dosi crescenti della molecola (0.1562–10 μM).

L'espressione di Cath B mostra una riduzione iniziale in seguito al trattamento con CA074Me, raggiungendo un minimo intorno a 0,312 μM. Tuttavia, l'effetto pare revertirsi a dosi superiori, si osserva infatti un parziale recupero dei livelli proteici. Questo andamento suggerisce l'assenza di una classica relazione farmacologica monotona, indicando come concentrazioni più elevate non descrivano un'ulteriore soppressione del target.

La catepsina L (Cath L) ha mostrato un andamento variabile dell'espressione. L'assenza di una relazione dose-risposta univoca o monotona suggerisce che, nelle condizioni sperimentali analizzate, il trattamento non eserciti un effetto regolatorio diretto e progressivo su questa proteina.

Analogamente, l'espressione di PDGFR α ha mostrato un trend generale di riduzione in risposta al trattamento, con un sensibile calo già alle concentrazioni intermedie e una marcata soppressione ai dosaggi più elevati. Per gli esperimenti successivi, si è dunque scelto di usare CA074Me alla concentrazione di 0.3 μ M, alla quale è stata rilevata una riduzione selettiva di catepsina B senza alterazioni significative degli altri marcatori.

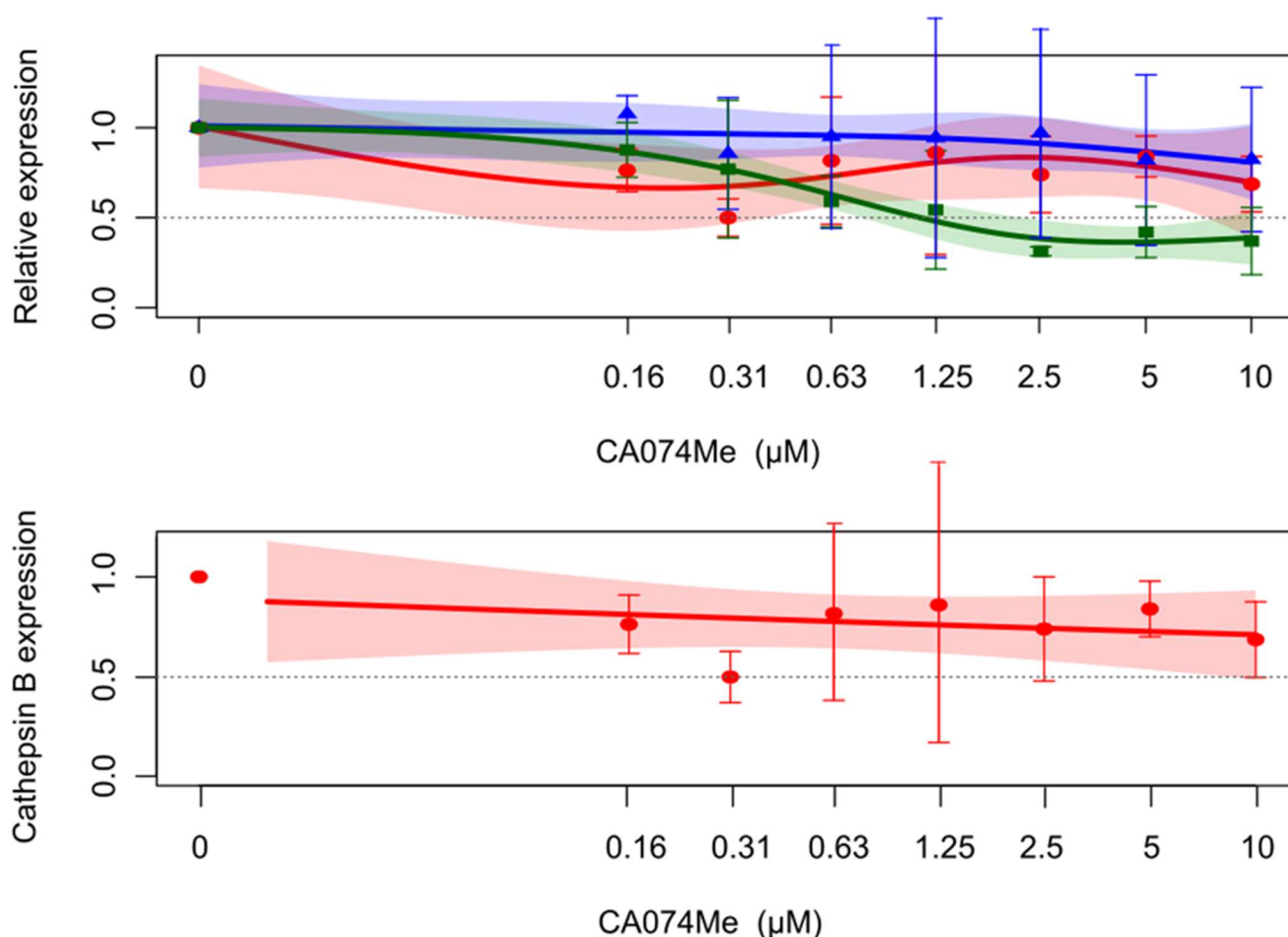


Figura 13: Analisi dose-risposta dell'espressione proteica dopo trattamento con CA074Me. Il grafico in alto rappresenta i profili di espressione relativa di PDGFR α (linea verde), catepsina B (linea rossa) e catepsina L (linea blu) a concentrazioni crescenti dell'inibitore CA074Me (0–10 μ M). Il grafico in basso rappresenta la modellizzazione dose-risposta dell'espressione di catepsina B.

Analogamente a quanto descritto, l'effetto dell'inibitore della catepsina L è stato valutato mediante Western blot su tre replicati biologici indipendenti, analizzando i livelli proteici di catepsina L, catepsina B e PDGFR α in risposta a concentrazioni crescenti di composto (0.1562–10 μ M).

Per quanto riguarda il target catepsina L, il trattamento ha determinato una modulazione dell'espressione caratterizzata da un trend di riduzione alle dosi più elevate. Sebbene a basse concentrazioni (0,001–0,005 μ M) i livelli proteici si mantengano prossimi al controllo, nel range 0,01–0,1 μ M si osserva una riduzione progressiva dell'espressione. La modellizzazione mediante

regressione log-logistica a quattro parametri (4PL) ha stimato una EC50 attorno ai 0,05 μM , confermando la sensibilità del target a concentrazioni sub-micromolari.

La catepsina B mostra un comportamento eterogeneo lungo l'intero intervallo di screening. In seguito a una lieve riduzione iniziale alle basse dosi, i livelli proteici fluttuano in assenza di un chiaro trend dose-dipendente. Nel complesso, non emerge una relazione farmacologica definita tra il trattamento e la modulazione della proteina nelle condizioni sperimentali analizzate.

Analogamente, PDGFR α mostra una risposta non uniforme al trattamento, nonostante si osservi un trend generale di riduzione rispetto al controllo alle concentrazioni intermedie e alte. Di conseguenza, anche per questa proteina non è possibile identificare una relazione dose-risposta strettamente monotona, pur rimanendo evidente una suscettibilità del target ai dosaggi più elevati.

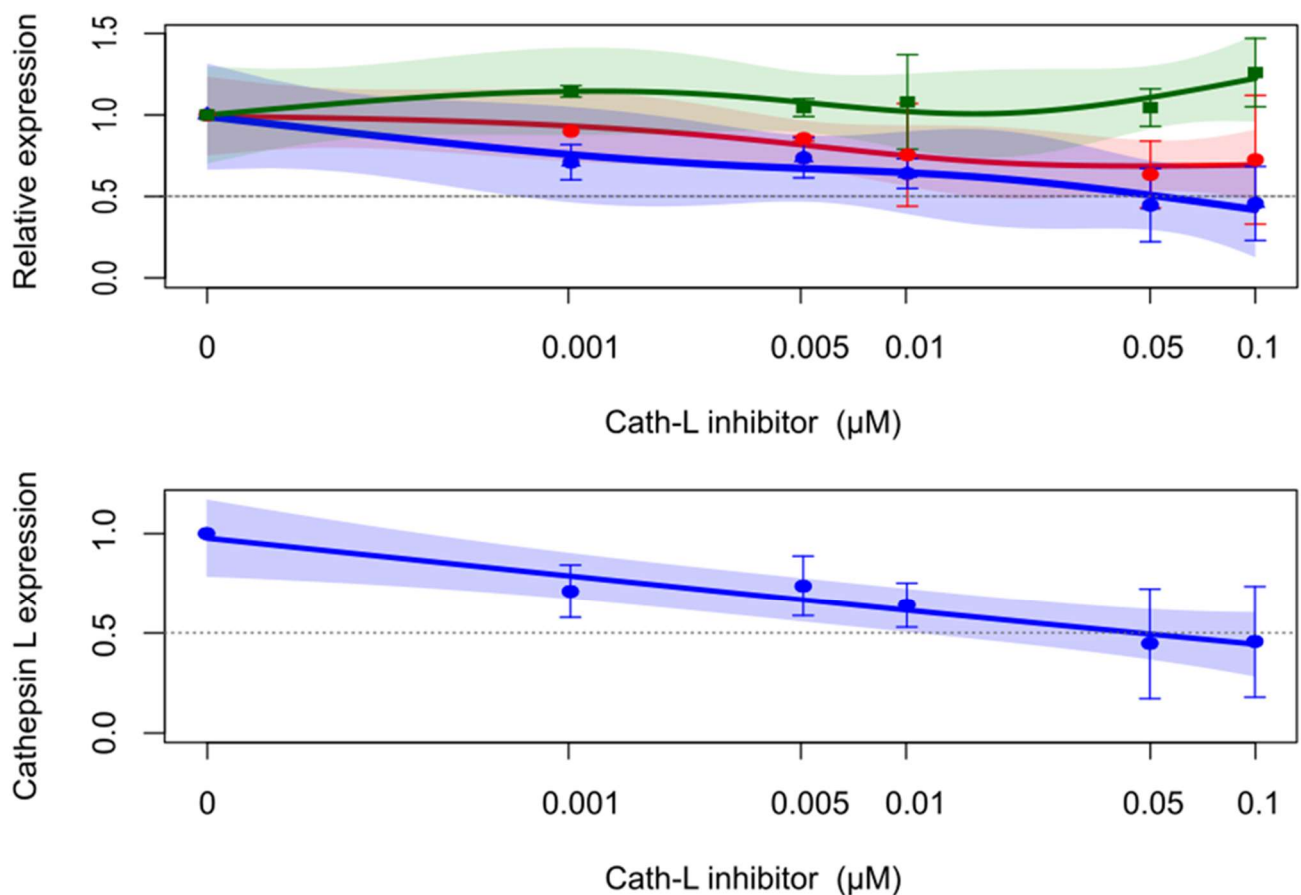


Figura 14: Analisi dose-risposta dell'espressione proteica dopo trattamento con inibitore di Cath-L. Il grafico in alto rappresenta i profili di espressione relativa di PDGFR α (linea verde), catepsina B (linea rossa) e catepsina L (linea blu) a concentrazioni crescenti dell'inibitore di Cath-L (0–0,1 μM). Il grafico in basso rappresenta la modellizzazione della curva dose-risposta per l'espressione di catepsina L (Cath L) mediante regressione log-logistica a quattro parametri (4PL).

4.3 Analisi della vitalità cellulare tramite saggio MTT

Nella linea cellulare di glioblastoma U251 il saggio MTT per lo studio della vitalità cellulare ha consentito di evidenziare come i trattamenti effettuati sulle cellule non hanno causato variazioni statisticamente significative della vitalità cellulare.

L'esposizione allo stress ossidativo ha riportato una vitalità di $86,13 \pm 5,06$ con una variabilità di -13,87% mentre l'esposizione all'infiammazione ha consentito di riscontrare una vitalità di $90,94 \pm 5,24$ con una variabilità di -9,06%. Quindi sia stress ossidativo che infiammazione riportano un decremento della vitalità non significativo rispetto al controllo anche se lo stress ossidativo ha una diminuzione della vitalità maggiore rispetto all'infiammazione.

Il trattamento con Imatinib, Ca074Me e Inibitore della catepsina L ha portato le cellule ad avere una vitalità rispettivamente di $94,99 \pm 8,4$, $96,41 \pm 3,35$ e $95,10 \pm 3,85$ con una diminuzione della vitalità di -5,01%, -3,59% e -4,90%.

La combinazione di stress ossidativo con i trattamenti in esame non ha riportato una variazione significativa rispetto alla sola esposizione allo stress ossidativo. Nello specifico nel caso di H_2O_2 + Imatinib ha riportato una vitalità di $87,12 \pm 10,67$ (-12,88%) mentre H_2O_2 + Ca074me $84,23 \pm 11,36$ (-15,77%) e infine H_2O_2 + inibitore della catepsina L $85,99 \pm 4,87$ (14,01%).

La combinazione invece di infiammazione e trattamento ha consentito di evidenziare un decremento della vitalità cellulare non significativo e molto simile a quello presente in seguito alla sola esposizione all'infiammazione. Infatti LPS + Imatinib presenta una vitalità di $91,07 \pm 10,91$ (-8,93%), LPS + Ca074Me $91,47 \pm 9,04$ (-8,53%) e LPS + inibitore catepsina L $90,89 \pm 3,51$ (-9,11%).

Andando a confrontare i dati ottenuti l'esposizione all'infiammazione ha causato la perdita di vitalità maggiore anche quando è associata a Imatinib, Ca074Me e Inibitore catepsina L infatti si hanno valore molto simili tra loro. Il trattamento con H_2O_2 invece porta ad una diminuzione minore della vitalità e si possono riscontrare valori simili se si confrontano i dati relativi alla sola esposizione allo stress ossidativo e alla sua combinazione con i trattamenti.

Questo evidenzia come siano i trattamenti con H_2O_2 e LPS a determinare principalmente la riduzione della vitalità cellulare rispetto a Imatinib, Ca074Me e Inibitore catepsina L che infatti presentano una variabilità minima rispetto al controllo.

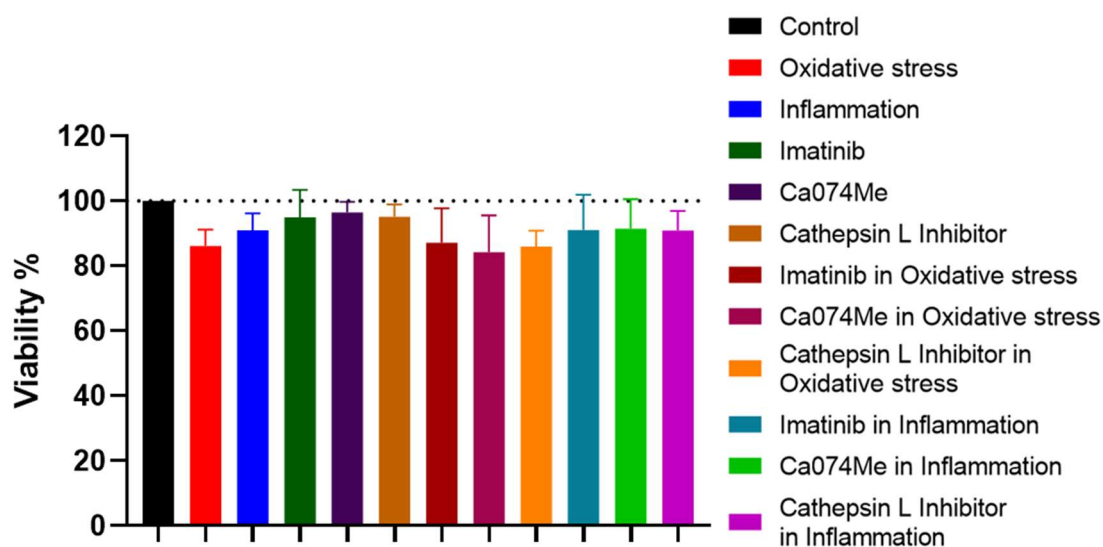


Figura 15: Istogramma relativo alla vitalità cellulare (%) nella linea cellulare U251. I dati sono espressi come percentuale rispetto al controllo (linea tratteggiata a 100%) e includono: Controllo, Stress ossidativo, Infiammazione, trattamenti singoli (Imatinib, CA074Me, Inibitore catepsina L) e relative combinazioni con stress ossidativo e infiammazione. È riportata la legenda cromatica delle condizioni.

4.2 Analisi di immunofluorescenza di WFDC2 e MMP2

Per valutare l'effetto dello stress ossidativo, dello stimolo infiammatorio e dell'inibizione farmacologica di PDGFR α , catepsina B e catepsina L sull'espressione di WFDC2, sono state eseguite analisi di immunofluorescenza nella linea cellulare di glioblastoma U251.

La proteina WFDC2 o HE4 è spesso sovraespressa nel glioblastoma andando ad influenzare la crescita e la migrazione delle cellule tumorali a causa della sua azione sulla via di segnalazione che promuove la transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

Una serie di reti di segnalazione intracellulare, tra cui la chinasi regolata extracellulare, la proteina chinasi attivata dai mitogeni (MAPK), la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), Akt, SMAD, β -catenina e le vie di segnalazione Ras, è coinvolta nel processo di EMT. Anche le molecole di superficie cellulare, tra cui le integrine β 4 e le integrine α 5 β 1 e α V β 6, sono associate alla trasmissione di segnali che promuovono l'EMT; questo viene di segnalazione sono indotte da WFDC2. (Nam et al., 2014)

Nelle cellule U251 WFDC2 ha un'espressione basale normalizzata al 100,00%.

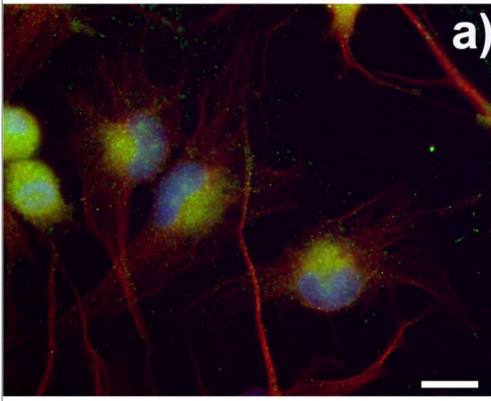


Figura 16: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 di controllo

L'esposizione allo stress ossidativo ha determinato un incremento dei livelli di WFDC2 del 36,99% rispetto al controllo ($136,99 \pm 20,41$), senza tuttavia raggiungere la significatività statistica ($p = 0,1027$).

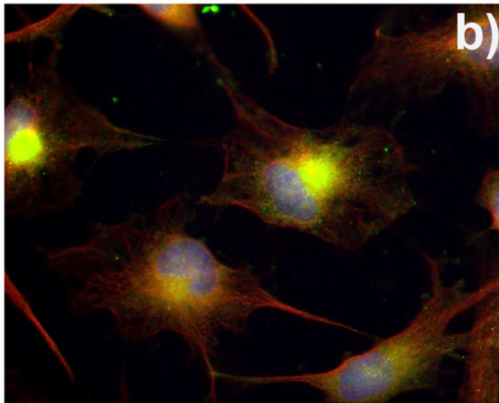


Figura 17: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate con H_2O_2

Al contrario, lo stimolo infiammatorio ha prodotto un aumento più contenuto, pari al 6,59% ($106,59 \pm 20,66$; $p > 0,9999$).

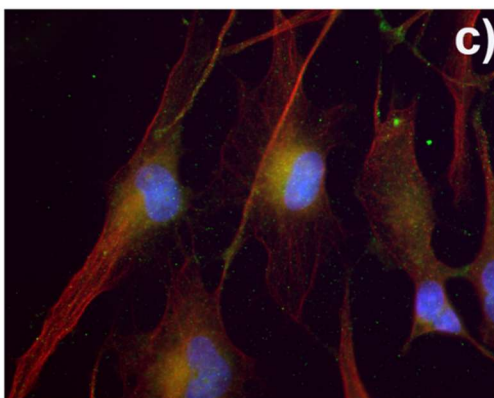


Figura 18: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate con LPS

Il trattamento con Imatinib ha determinato una lieve riduzione del 4,53% rispetto al controllo ($95,47 \pm 16,15$; $p > 0,9999$), mentre sia il CA074Me sia l'inibitore della catepsina L hanno mostrato valori sostanzialmente sovrapponibili alle condizioni basali (rispettivamente $100,71 \pm 13,23$ e $98,40 \pm 16,3$; $p > 0,9999$ per entrambi).

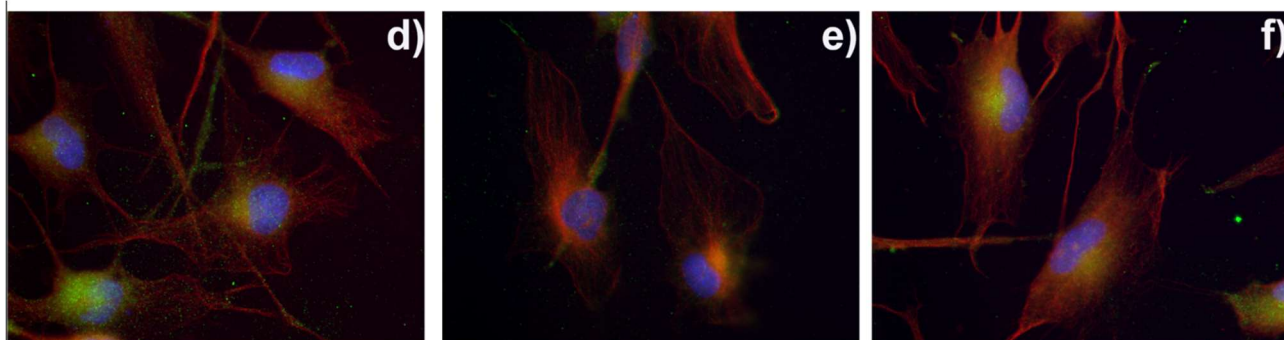


Figura 19: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate con Imatinib, Ca074me e Inibitore di Catepsina L.

L'associazione tra stress ossidativo e imatinib ha prodotto un valore di $114,09 \pm 29,23$ (+14,09% rispetto al controllo; $p = 0,9796$), mentre il trattamento con CA074Me in condizioni di stress ossidativo ha determinato il livello più elevato di espressione osservato, pari a $143,27 \pm 15,41$. Tale valore è risultato superiore del 43,27% rispetto al controllo ($100,00 \pm 3,74$), con differenza statisticamente significativa ($p = 0,0073$).

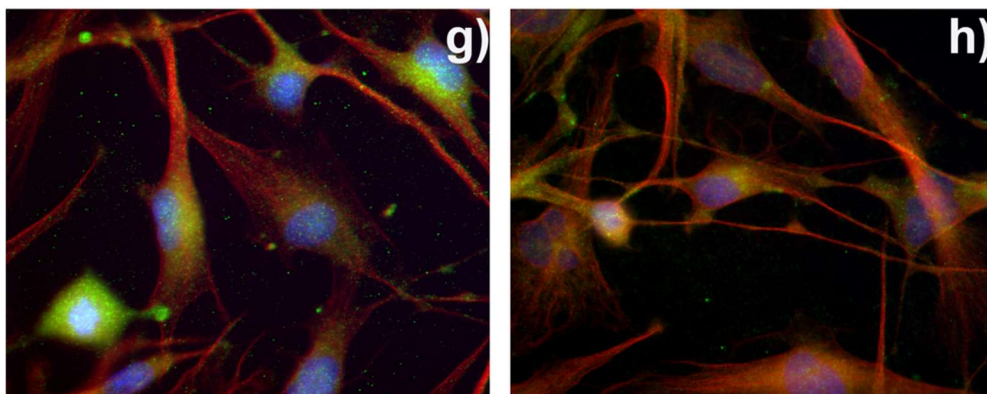


Figura 20: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate H_2O_2 +imatinib e H_2O_2 +Ca074me

Inoltre, il gruppo trattato con CA074Me in condizioni di stress ossidativo ha mostrato un incremento dell'espressione pari al 42,26% rispetto al farmaco da solo ($143,27 \pm 15,41$ vs $100,71 \pm 3,23$; $p = 0,0157$) e un aumento del 33,95% rispetto alla co-esposizione con lo stimolo infiammatorio ($106,96 \pm 26,97$). Entrambi i confronti sono risultati statisticamente significativi, con un valore di $p = 0,0480$ per quest'ultimo saggio.

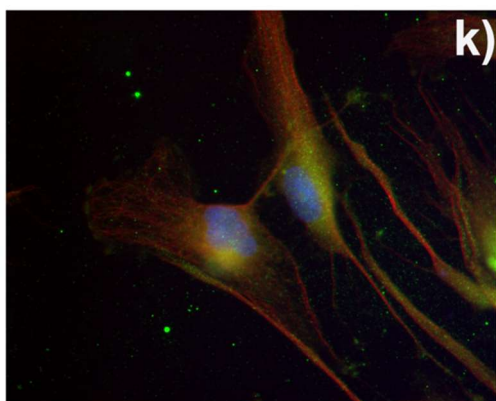


Figura 21: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate con LPS-Ca074me

In condizioni di stress ossidativo, la co-esposizione con l'inibitore della catepsina L ha determinato un valore di $134,68 \pm 7,50$. Tale dato corrisponde a un incremento del 34,68% rispetto al controllo basale ($p = 0,1032$) e del 36,87% rispetto al solo inibitore ($98,40 \pm 16,34$; $p = 0,0728$); tuttavia, in entrambi i casi non è stata raggiunta la piena significatività statistica.

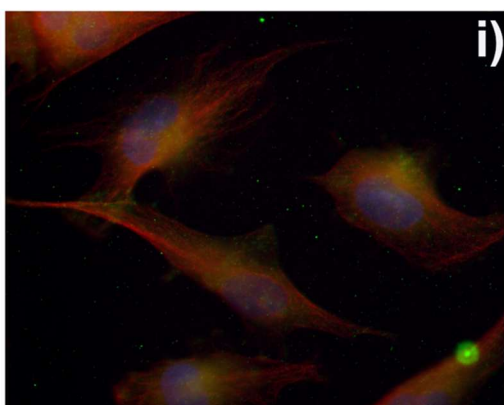


Figura 22: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate con H_2O_2 + inibitore catepsina L

In presenza di stimolo infiammatorio, i co-trattamenti con Imatinib, CA074Me e l'inibitore della catepsina L hanno fatto registrare valori di espressione pari, rispettivamente, al $93,87 \pm 10,20$, $106,96 \pm 26,97$ e $103,34 \pm 22,93$. Nessuna di queste combinazioni ha mostrato variazioni significative rispetto al gruppo trattato con la sola condizione infiammatoria ($106,59 \pm 20,66$), con valori di p pari a 0,9866 per Imatinib e $>0,9999$ sia per CA074Me che per l'inibitore di Cath L.

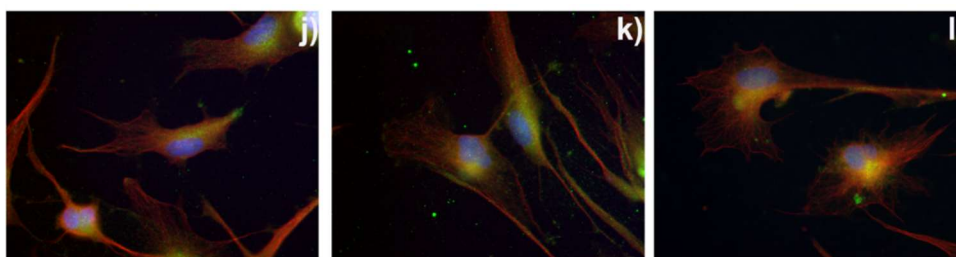


Figura 23: immunofluorescenza di WFDC2 su U251 trattate con LPS+Imatinib, LPS+Ca074me e LPS+inibitore catepsina L

Il confronto diretto tra stress ossidativo e infiammazione non ha evidenziato differenze significative ($136,99 \pm 20,41$ vs $106,59 \pm 20,66$; $p = 0,3224$). Tutti gli altri confronti non descritti hanno mostrato $p \geq 0,0728$ o $p > 0,9999$, indicando assenza di differenze statisticamente significative.

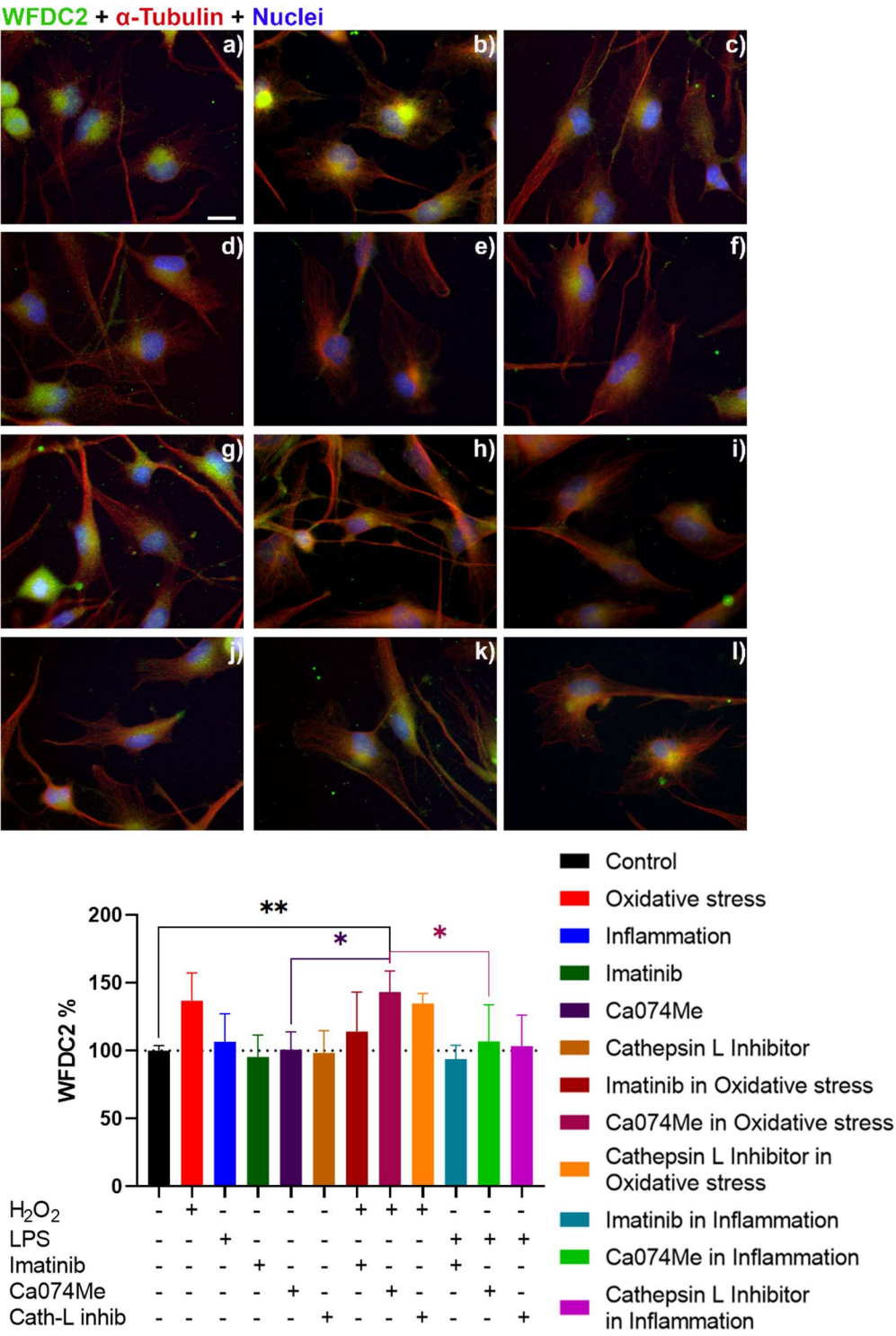


Figura 24: Immunofluorescenza in U251 di WFDC2: tripla marcatura di β -actina (verde), α -tubulina (rosso) e nuclei (blu). Pannelli (a–l, rispettivamente a) Control, b) Oxidative stress, c) Inflammation, d) Imatinib, e) Ca074Me, f) Cathepsin-L inhibitor, g) Imatinib in Oxidative stress, h) CA074Me in Oxidative stress, i)

Inibitore specifico di Catepsina L in Oxidative stress, j) Imatinib in Inflammation, k) CA074Me in Inflammation, l) Inibitore specifico di Catepsina L in Inflammation) rappresentativi per visualizzare l'organizzazione del citoscheletro e la morfologia cellulare nelle diverse condizioni sperimentali. Ingrandimento: 60X.

*Sottostante è riportato l'istogramma relativo alla quantificazione di WFDC2 in U251 (espresso in % rispetto al controllo, linea tratteggiata = 100%) in condizioni di H₂O₂, LPS, inibitori (Imatinib, Ca074Me, inibitore di Cathepsin L) e relative combinazioni. Statistica: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.*

Il segnale di WFDC2, marcato in verde, si concentra maggiormente nella regione perinucleare; è possibile anche notare segnali puntiformi di WFDC2 anche in zone più lontane dal nucleo.

Per investigare il coinvolgimento della metalloproteinasi MMP2 nei processi associati allo stress ossidativo, all'infiammazione e all'inibizione farmacologica di PDGFR α , catepsina B e catepsina L, è stata valutata l'espressione della proteina mediante immunofluorescenza nella linea cellulare di glioblastoma U251.

Nel GB l'espressione di diverse MMP, in particolare MMP-2 e MMP-9, è significativamente aumentata e la loro maggiore attività è correlata alla crescita tumorale invasiva e alla rottura della barriera emato-encefalica (BEE).

Questi enzimi regolano in modo critico l'invasione tumorale e la metastasi mediando la transizione epitelio-mesenchimale (EMT), degradando i componenti della matrice extracellulare (ECM) e promuovendo l'angiogenesi tumorale. (Zheng et al., 2025)

Nelle cellule U251 il gruppo controllo ha mostrato un'espressione normalizzata di MMP2 pari a $100,00 \pm 9,03$.

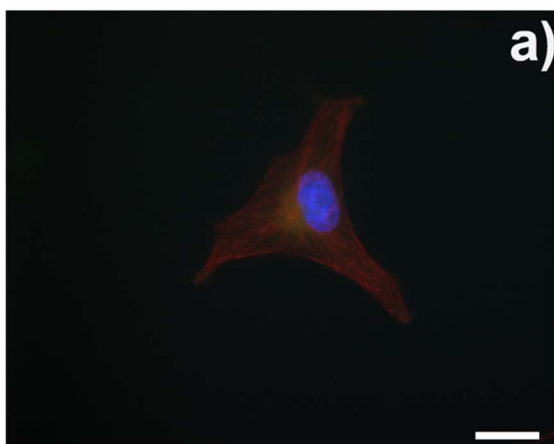


Figura 25: immunofluorescenza di MMP2 in U251 di controllo

Lo stress ossidativo ha determinato un incremento del 26,15% ($126,15 \pm 7,41$), senza raggiungere la significatività statistica rispetto al controllo ($p = 0,3719$).

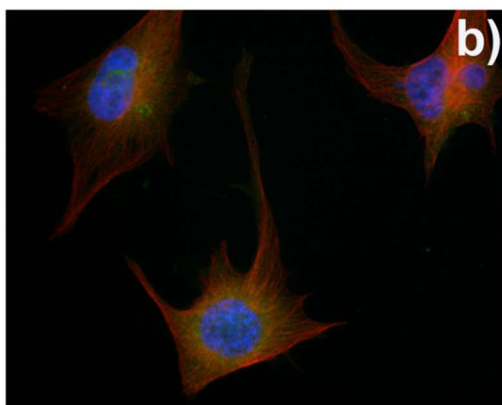


Figura 26: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con H_2O_2

Anche lo stimolo infiammatorio ha prodotto un lieve aumento del 7,48% ($107,48 \pm 3,68$), non significativo ($p = 0,9999$).

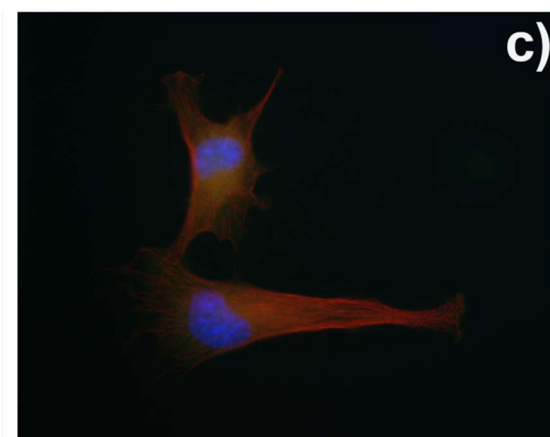


Figura 27: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con LPS

Il trattamento singolo con Imatinib ha ridotto l'espressione di MMP2 del 20,59% rispetto al controllo ($79,41 \pm 16,93$; $p = 0,6336$). Un decremento ancora più marcato, pari al 28,91%, è stato osservato in seguito all'esposizione a CA074Me ($71,09 \pm 25,64$; $p = 0,1625$). Anche l'inibitore della catepsina L ha indotto una flessione del 24,65% rispetto alle condizioni basali ($75,35 \pm 20,02$; $p = 0,3649$), sebbene nessuno dei trattamenti abbia raggiunto la significatività statistica.

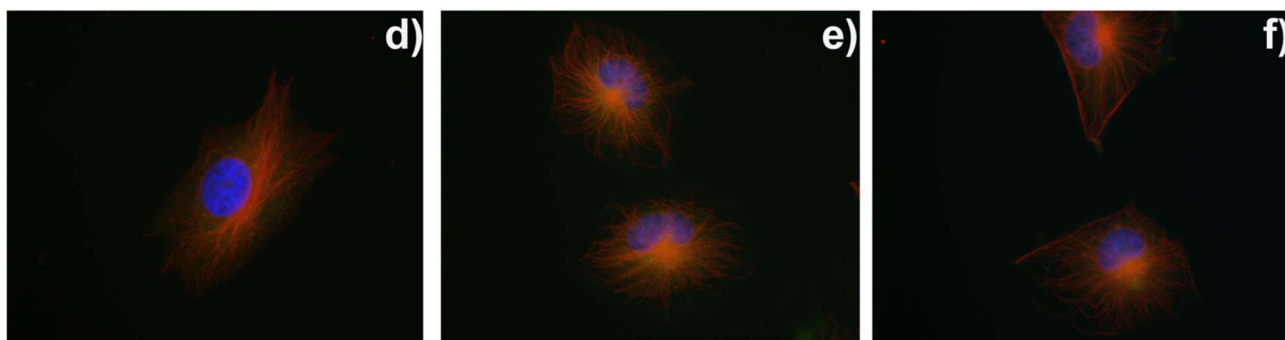


Figura 28: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con Imatinib, CA074Me, inibitore della catepsina L

In presenza di stress ossidativo, la co-esposizione con Imatinib ha determinato un valore di $94,49 \pm 14,78$. Tale dato corrisponde a una riduzione del 25,10% rispetto al gruppo sottoposto a solo stress ossidativo ($126,15 \pm 7,41$), senza tuttavia raggiungere la significatività statistica ($p = 0,1743$).

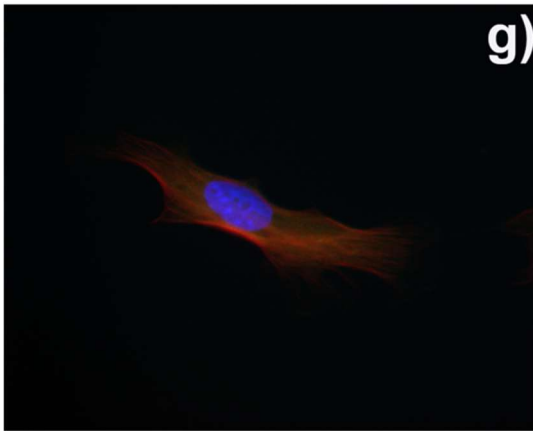


Figura 29: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con H_2O_2 +Imatinib,

In condizioni di stress ossidativo, il co-trattamento con CA074Me ha fatto registrare un livello di espressione pari a $107,48 \pm 19,86$. Tale valore è risultato superiore del 51,19% rispetto al gruppo trattato con il solo inibitore ($71,09 \pm 25,64$), evidenziando un incremento statisticamente significativo ($p = 0,0386$).

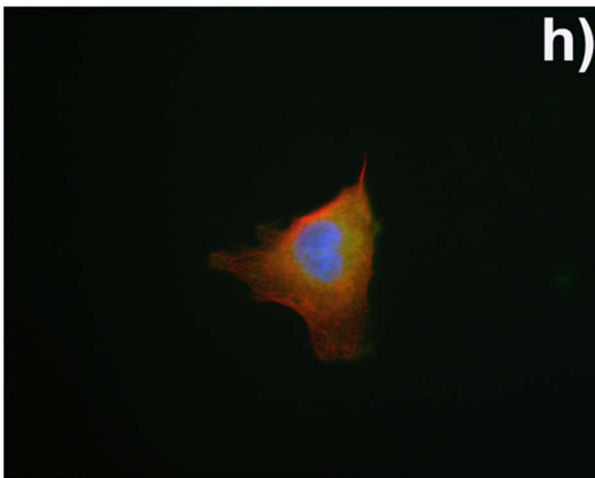


Figura 30: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con H_2O_2 +CA074Me

In condizioni di stress ossidativo, la co-esposizione con l'inibitore della catepsina L ha determinato il valore più elevato registrato nell'intero disegno sperimentale ($131,43 \pm 17,64$). Tale dato corrisponde a un incremento del 74,43% rispetto al trattamento con il solo farmaco ($75,35 \pm 20,02$), evidenziando una differenza altamente significativa ($p < 0,0001$). Inoltre, questo gruppo ha mostrato un aumento del 39,10% rispetto alla combinazione di Imatinib e stress ossidativo ($94,49 \pm 14,78$), anch'esso statisticamente significativo ($p = 0,0217$).

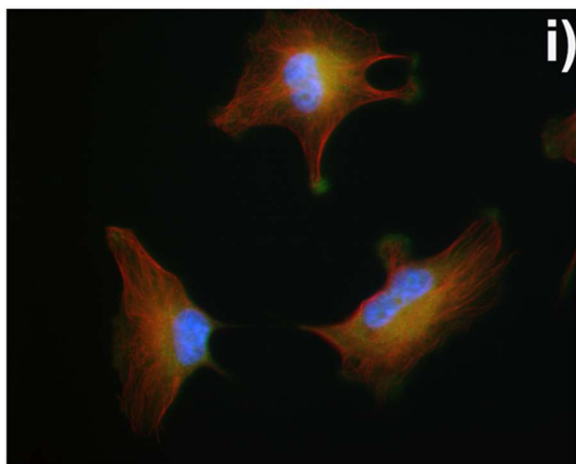


Figura 31: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con H₂O₂+inibitore catepsina L

In presenza di stimolo infiammatorio, il co-trattamento con Imatinib ha fatto registrare un valore di $97,54 \pm 12,30$, inferiore del 9,25% rispetto al gruppo sottoposto a sola infiammazione ($107,48 \pm 3,68$; $p = 0,9987$). L'esposizione combinata a CA074Me ha mostrato un valore di $89,56 \pm 9,77$ (-16,67% rispetto al solo stimolo infiammatorio; $p = 0,8851$), mentre l'aggiunta dell'inibitore della catepsina L ha determinato un valore di $95,91 \pm 20,89$, corrispondente a un decremento del 10,76% ($p = 0,9951$); nessuno di questi interventi ha tuttavia raggiunto la significatività statistica.

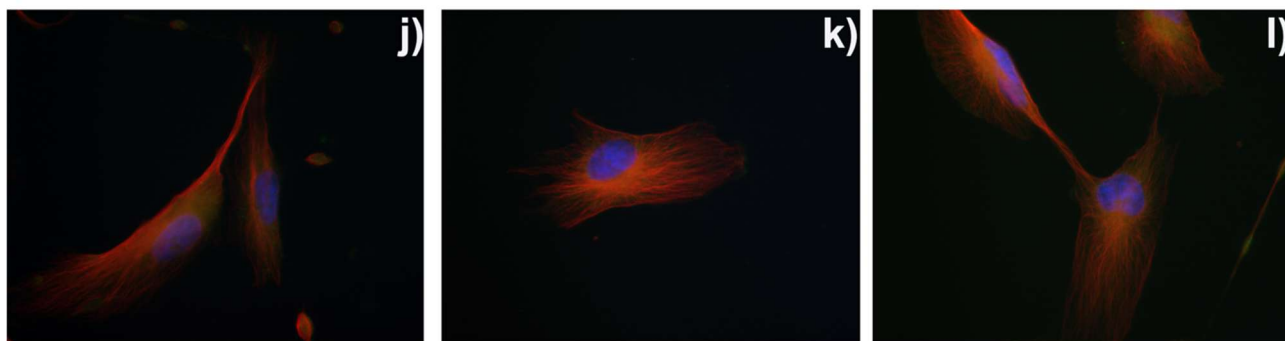


Figura 32: immunofluorescenza di MMP2 in U251 trattato con LPS+Imatinib, LPS+Ca074Me, LPS+inibitore catepsina L

Il gruppo trattato con inibitore della catepsina L in presenza di stress ossidativo ($131,43 \pm 17,64$) ha mostrato un'espressione significativamente superiore del 37,04% rispetto al corrispondente gruppo trattato con inibitore della catepsina L in condizioni infiammatorie ($95,91 \pm 20,89$; $p = 0,0322$).

Il confronto tra stress ossidativo e infiammazione non ha evidenziato differenze significative ($126,15 \pm 7,41$ vs $107,48 \pm 3,68$; $p = 0,8926$). Tutti gli altri confronti non descritti hanno mostrato p elevato, indicando assenza di differenze statisticamente significative.

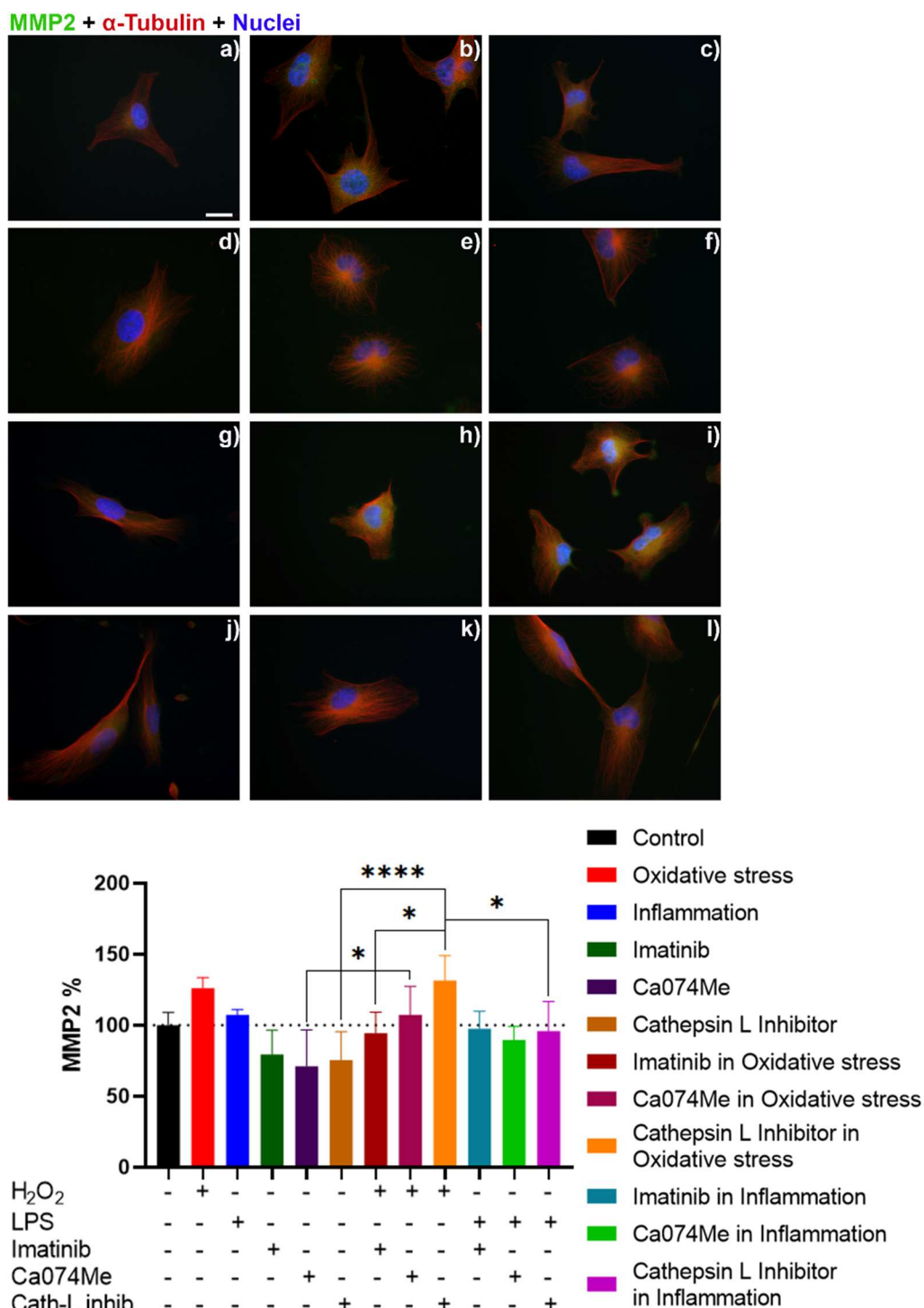


Figura 33: Immunofluorescenza in U251 di MMP2: tripla marcatura di β -actina (verde), α -tubulina (rosso) e nuclei (blu). Pannelli (a–l, rispettivamente a) Control, b) Oxidative stress, c) Inflammatino, d) Imatinib, e) Ca074Me, f) Cathepsin-L inhibitor, g) Imatinib in Oxidative stress, h) CA074Me in Oxidative stress, i) Inibitore specifico di Catepsina L in Oxidative stress, j) Imatinib in Inflammation, k) CA074Me in Inflammation, l) Inibitore specifico di Catepsina L in Inflammation) rappresentativi per visualizzare l'organizzazione del citoscheletro e la morfologia cellulare nelle diverse condizioni sperimentali. Ingrandimento: 60X.

*Sottostante è riportato l'istogramma relativo alla quantificazione di MMP2 in U51 (espresso in % rispetto al controllo, linea tratteggiata = 100%) in condizioni di H₂O₂, LPS, inibitori (Imatinib, CA074Me, inibitore di Cathepsin L) e relative combinazioni. Statistica: *p < 0.05; ****p < 0.0001.*

La proteina MMP2 è localizzata principalmente a livello della zona perinucleare ma si in generale si ha una marcatura diffusa in tutto il corpo cellulare. È possibile inoltre notare nella maggior parte dei casi una sovrapposizione della marcatura verde di MMP2 con la marcatura rossa dell' α -tubulina indicando una loro colocalizzazione.

Al fine di valutare l'impatto degli stimoli ambientali e dell'inibizione farmacologica di PDGFR α , catepsina B e catepsina L sulla morfologia cellulare, sono stati quantificati il numero e la lunghezza delle protrusioni citoplasmatiche.

Nelle cellule U251, il gruppo di controllo ha mostrato un numero medio di protrusioni citoplasmatiche pari a $27,00 \pm 6,83$ per cellula. L'esposizione allo stress ossidativo ha determinato una riduzione significativa del 57,41% di tali strutture ($11,50 \pm 1,29$; p = 0,0012), mentre lo stimolo infiammatorio ha indotto un decremento più contenuto, pari al 25,93% ($20,00 \pm 6,22$), senza tuttavia raggiungere la significatività statistica.

Il trattamento singolo con Imatinib ha ridotto significativamente il numero di protrusioni del 60,19% rispetto al controllo ($10,75 \pm 4,03$; p = 0,0006). Analogamente, l'esposizione a CA074Me e all'inibitore della catepsina L ha determinato una forte contrazione di tali strutture, pari rispettivamente al 56,78% ($11,67 \pm 2,31$; p = 0,0037) e al 54,63% ($12,25 \pm 5,56$; p = 0,0023); entrambi i decrementi sono risultati statisticamente molto significativi.

In condizioni di stress ossidativo, la co-esposizione con Imatinib ha determinato un valore di $12,75 \pm 1,26$, risultando sostanzialmente sovrapponibile a quanto osservato con il solo stimolo ossidativo. Al contrario, l'aggiunta di CA074Me ha indotto un ulteriore crollo del numero di protrusioni, attestatosi a $6,25 \pm 2,63$; tale dato corrisponde a un decremento del 76,85% rispetto al controllo basale, evidenziando una differenza altamente significativa (p < 0,0001). Infine, anche l'inibitore della catepsina L in ambiente ossidativo ha mostrato una riduzione significativa del 44,44% rispetto al controllo, con un valore pari a $15,00 \pm 3,56$ (p = 0,0239).

In presenza di stimolo infiammatorio, il co-trattamento con Imatinib ha indotto un marcato aumento del numero di protrusioni, portando il valore a $25,67 \pm 1,15$. Questo dato è risultato superiore del 137,05% rispetto a quanto registrato con il farmaco da solo ($10,75 \pm 4,03$), evidenziando un incremento statisticamente molto significativo (p = 0,0052). Inoltre, la combinazione di Imatinib e infiammazione ha mostrato un aumento del 123,22% rispetto alla co-esposizione dello stesso inibitore con lo stress ossidativo ($12,75 \pm 1,26$), confermando una significatività statistica rilevante (p = 0,0248).

Sotto l'influsso dello stimolo infiammatorio, l'inibizione della catepsina B tramite CA074Me ha fatto registrare un valore medio di protrusioni pari a $18,25 \pm 7,59$, evidenziando un incremento del 192,00% rispetto alla medesima condizione farmacologica combinata con lo stress ossidativo ($6,25 \pm 2,63$; $p = 0,0239$). Al contrario, l'aggiunta dell'inibitore della catepsina L in ambiente infiammatorio ha mantenuto il parametro significativamente depresso rispetto al controllo basale, attestandosi a $15,50 \pm 2,89$ (riduzione del 42,59%; $p = 0,0356$). Tutti i restanti confronti incrociati non hanno mostrato variazioni statisticamente rilevanti.

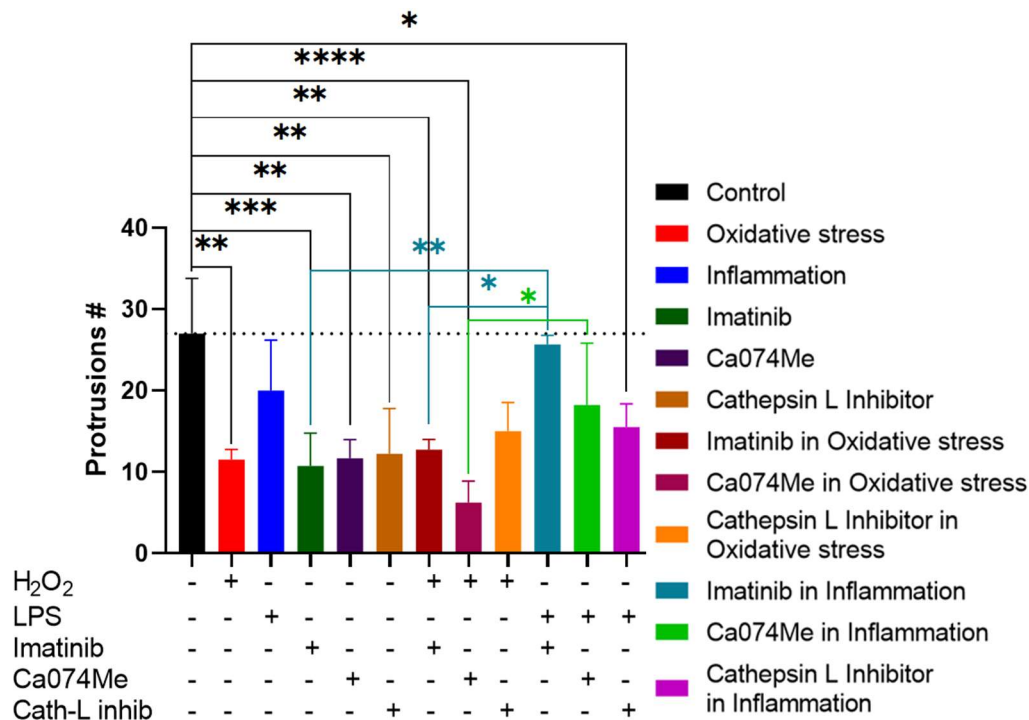


Figura 34: Istogramma relativo alla quantificazione del numero di protrusioni cellulari in condizioni di controllo ed esposizione a H₂O₂, LPS, inibitori (Imatinib, Ca074Me, inibitore di Cathepsin L) e relative combinazioni. Statistica: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Nelle cellule U251 il gruppo controllo ha mostrato una lunghezza media delle protrusioni pari a $0,26 \pm 0,04$. Lo stress ossidativo ($0,28 \pm 0,03$) ha determinato un incremento del 7,69%, mentre l'infiammazione ($0,23 \pm 0,06$) ha mostrato una riduzione dell'11,54%, senza differenze statisticamente rilevanti.

In condizioni basali, il trattamento con Imatinib ha ridotto la lunghezza media delle protrusioni del 26,92% ($0,19 \pm 0,05$) rispetto al controllo. L'esposizione a CA074Me ha determinato un decremento ancora più pronunciato, pari al 42,31% ($0,15 \pm 0,01$), mostrando un trend borderline rispetto alla significatività statistica ($p = 0,0500$). Al contrario, l'inibitore della catepsina L ha fatto registrare valori sostanzialmente sovrapponibili a quelli del gruppo di controllo ($0,24 \pm 0,07$).

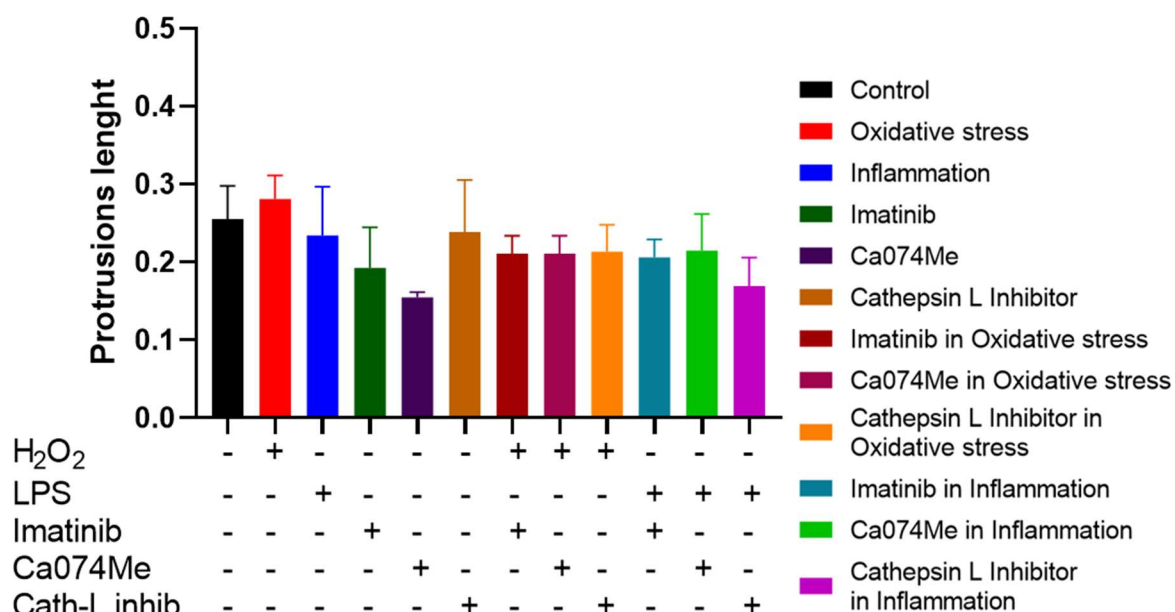


Figura 35: Istogramma relativo alla quantificazione della lunghezza delle protrusioni cellulari in condizioni di controllo e dopo esposizione a H₂O₂, LPS, inibitori (Imatinib, Ca074Me, inibitore di Cathepsin L) e relative combinazioni.

4.4 Analisi dell'attività migratoria

Per valutare il comportamento migratorio delle cellule di glioblastoma, è stata analizzata la capacità di migrazione della linea cellulare U251 in seguito all'esposizione a stress ossidativo (H₂O₂), infiammazione (LPS), trattamento con Imatinib, Ca074Me e inibitore della catepsina L, nonché alle rispettive combinazioni tra stimoli e trattamenti.

Il controllo della linea cellulare U251 è stato normalizzato al 100% della capacità migratoria.

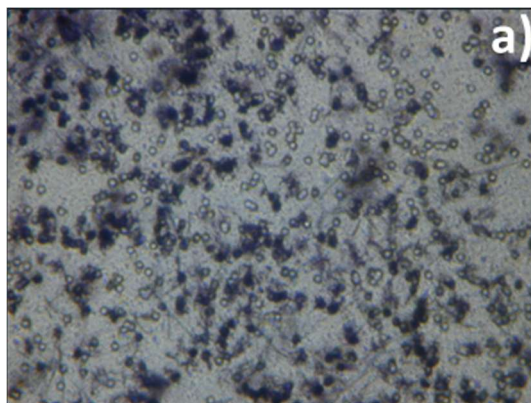


Figura 36: immagine al microscopio ottico del saggio di migrazione su U251 di controllo

L'esposizione allo stress ossidativo ha determinato un aumento statisticamente significativo della migrazione cellulare ($121,31 \pm 17,57\%$), corrispondente a un incremento del 21,31% rispetto al controllo ($p = 0,0283$).

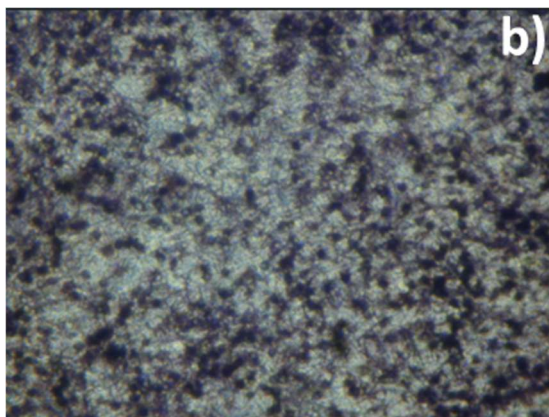


Figura 36: immagine al microscopio ottico del saggio di migrazione su U251 trattate con H_2O_2

L'esposizione all'inflammatione mediante LPS ha determinato una migrazione pari a $106,32 \pm 10,21\%$, corrispondente a un incremento del 6,32% rispetto al controllo; tale aumento non è risultato statisticamente significativo ($p = 0,9912$). L'esposizione all'inflammatione ha porta ad una migrazione cellulare pari a $106,32 \pm 10,21$ con una variabilità pari a 6,32% ($p = 0,9912$; aumento non significativo).

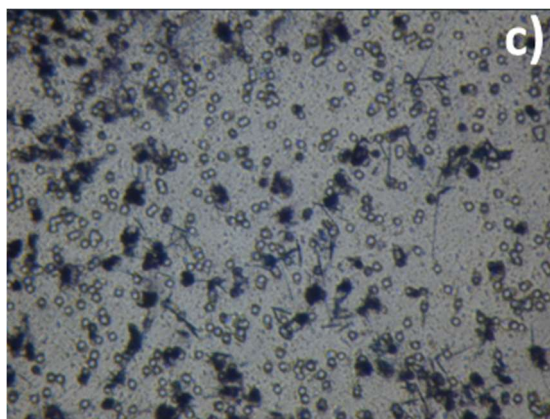


Figura 37: immagine al microscopio ottico del saggio di migrazione su U251 trattate con LPS

Il trattamento con Imatinib ha determinato una lieve riduzione della capacità migratoria delle cellule U251, con un valore pari a $94,04 \pm 6,59\%$, corrispondente a una diminuzione del 5,96% rispetto al controllo, senza raggiungere la significatività statistica ($p = 0,9898$). Analogamente, il trattamento con Ca074Me e con l'inibitore della catepsina L non ha modificato significativamente la migrazione cellulare. In particolare, Ca074Me ha determinato una migrazione pari a $105,57 \pm 5,38\%$ (+5,57%; $p = 0,9941$), mentre l'inibitore della catepsina L ha mostrato un valore di $110,32 \pm 6,76\%$ (+10,32%; $p = 0,7050$).

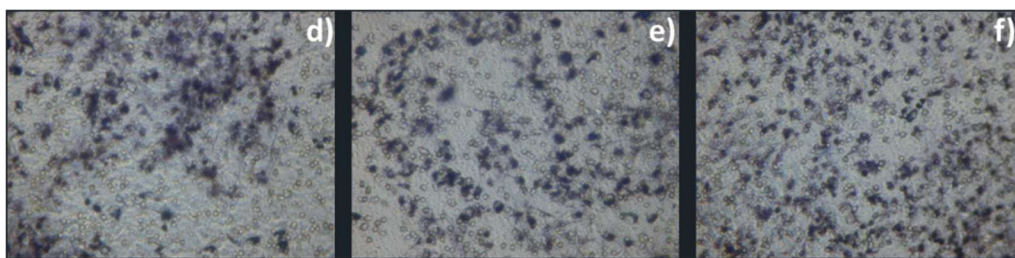


Figura 38: immagine al microscopio ottico del saggio di migrazione su U251 trattate con Imatinib, Ca074Me, Inibitore catepsina L

L'esposizione combinata della linea cellulare U251 a stress ossidativo e farmacologici non ha determinato variazioni significative della migrazione cellulare rispetto al controllo. In particolare, il trattamento H_2O_2 + Imatinib ha mostrato un valore di migrazione pari a $82,94 \pm 4,70\%$, corrispondente a una riduzione del 17,06% ($p = 0,1510$). La combinazione H_2O_2 + Ca074Me ha determinato una migrazione di $104,85 \pm 8,66\%$ (+4,85%; $p = 0,9982$), mentre H_2O_2 + inibitore della catepsina L ha mostrato un valore di $102,57 \pm 7,77\%$ (+2,57%; $p > 0,9999$); entrambi gli incrementi non sono risultati statisticamente significativi.

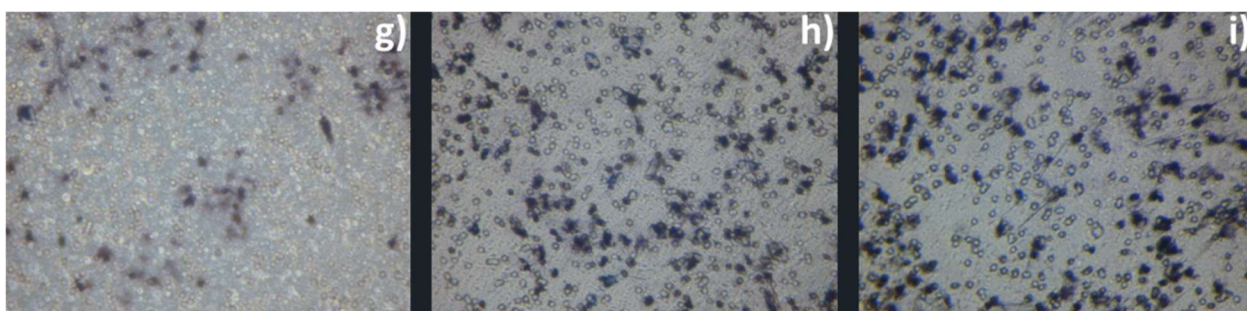


Figura 39: immagine al microscopio ottico del saggio di migrazione su U251 trattate H_2O_2 +Imatinib, H_2O_2 + Ca074Me, H_2O_2 + Inibitore catepsina L

Diversamente, l'associazione tra infiammazione e trattamenti farmacologici ha evidenziato una riduzione della migrazione cellulare. La combinazione LPS + Imatinib ha determinato un valore di $83,47 \pm 1,12\%$, corrispondente a una diminuzione del 16,53% rispetto al controllo, non statisticamente significativa ($p = 0,1808$). La combinazione LPS + Ca074Me ha invece ridotto significativamente la migrazione a $75,49 \pm 1,43\%$ (-24,51%; $p = 0,0068$), mentre LPS + inibitore della catepsina L ha mostrato il valore più basso, pari a $67,20 \pm 0,36\%$, corrispondente a una riduzione del 32,80% rispetto al controllo ($p = 0,0001$).

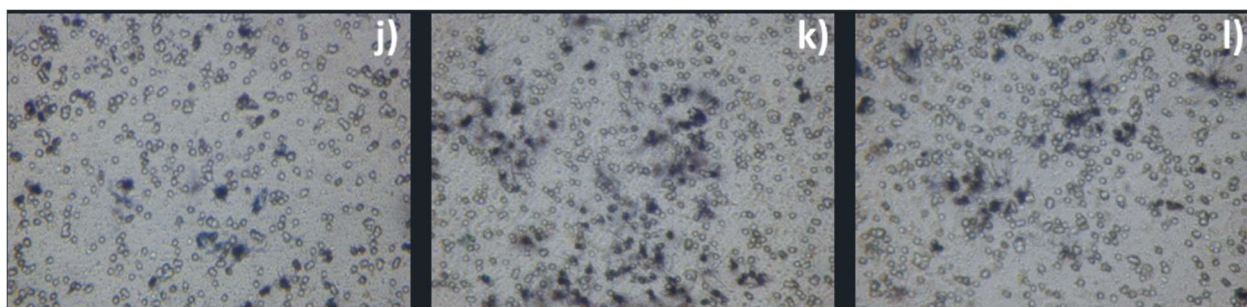


Figura 40: immagine al microscopio ottico del saggio di migrazione su U251 trattate LPS+Imatinib, LPS + Ca074Me, LPS + Inibitore catepsina L

Il confronto diretto tra stress ossidativo ($121,31 \pm 17,57\%$) e infiammazione ($106,32 \pm 10,21\%$) non ha evidenziato differenze statisticamente significative nella capacità migratoria ($p = 0,3858$), sebbene entrambi i trattamenti abbiano determinato un aumento della migrazione rispetto al controllo.

Confrontando H_2O_2 con $H_2O_2 + Imatinib$ è emersa una significativa riduzione della migrazione cellulare ($82,94 \pm 4,70\%$; $p < 0,0001$). Al contrario, i confronti tra H_2O_2 e $H_2O_2 + Ca074Me$ ($104,85 \pm 8,66\%$; $p = 0,1850$) e tra H_2O_2 e $H_2O_2 + inibitore della catepsina L$ ($102,57 \pm 7,77\%$; $p = 0,0810$) non hanno evidenziato differenze significative.

Il confronto tra LPS ($106,32 \pm 10,21\%$) e le rispettive combinazioni con Imatinib ($83,47 \pm 1,12\%$), Ca074Me ($75,49 \pm 1,43\%$) e inibitore della catepsina L ($67,20 \pm 0,36\%$) ha mostrato una significativa riduzione della migrazione cellulare nei trattamenti combinati ($p = 0,0275$; $p = 0,0009$; $p < 0,0001$, rispettivamente).

Confrontando Imatinib ($94,04 \pm 6,59\%$) con Ca074Me ($105,57 \pm 5,38\%$), inibitore della catepsina L ($110,32 \pm 6,76\%$), $H_2O_2 + Imatinib$ ($82,94 \pm 4,70\%$) e LPS + Imatinib ($83,47 \pm 1,12\%$) non sono emerse differenze statisticamente significative ($p = 0,5584$; $p = 0,1252$; $p = 0,7102$; $p = 0,7650$).

Analogamente, il confronto tra Ca074Me ($105,57 \pm 5,38\%$) e inibitore della catepsina L ($110,32 \pm 6,76\%$) o $H_2O_2 + Ca074Me$ ($104,85 \pm 8,66\%$) non ha evidenziato differenze significative ($p = 0,9985$ e $p > 0,9999$). Al contrario, il confronto con LPS + Ca074Me ($75,49 \pm 1,43\%$) ha mostrato una significativa riduzione della migrazione cellulare ($p = 0,0005$).

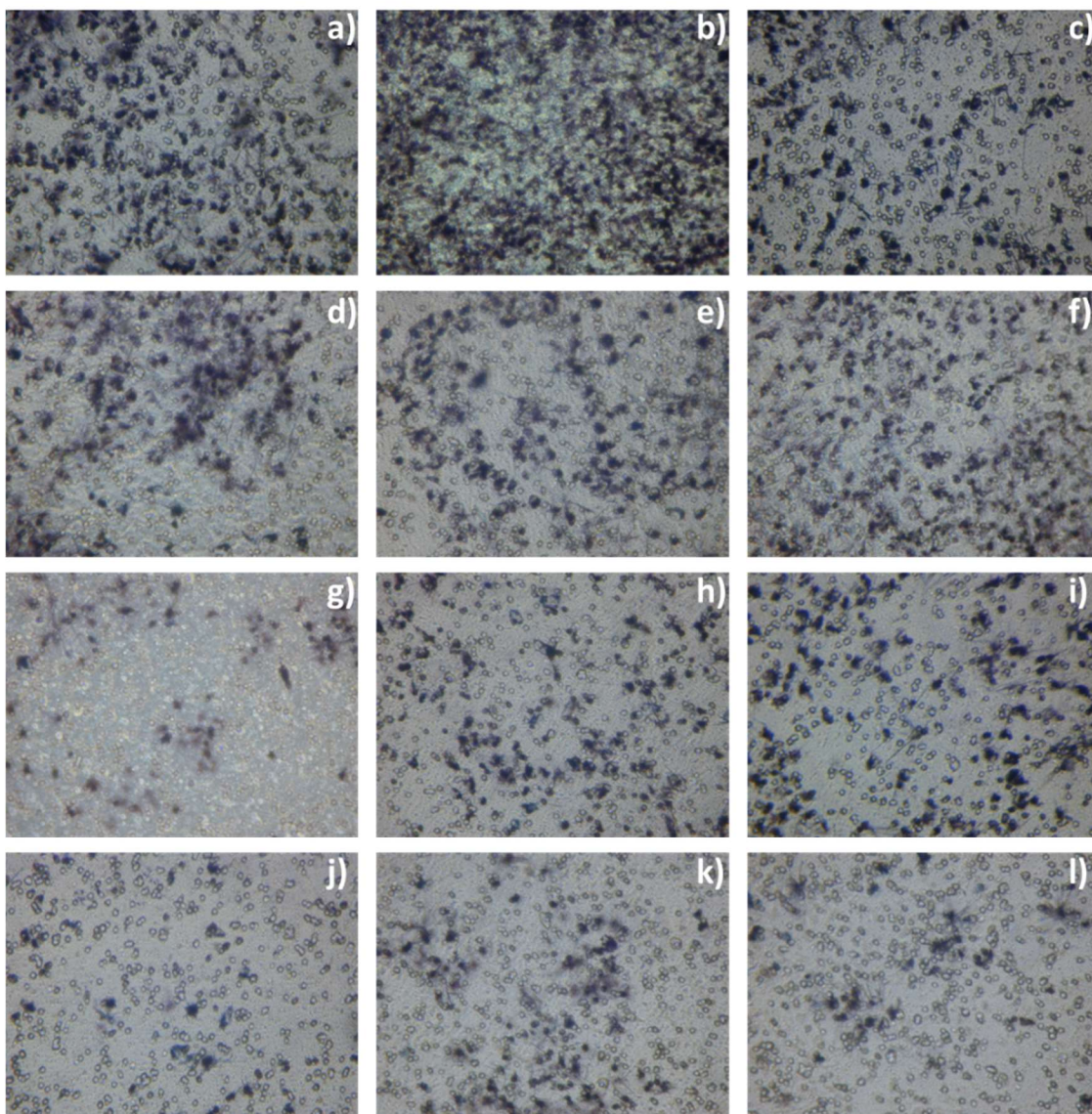
Il confronto tra l'inibitore della catepsina L ($110,32 \pm 6,76\%$) e $H_2O_2 + inibitore della catepsina L$ ($102,57 \pm 7,77\%$) non ha evidenziato differenze significative ($p = 0,9337$), mentre il confronto con LPS + inibitore della catepsina L ($67,20 \pm 0,36\%$) ha mostrato una significativa diminuzione della migrazione ($p < 0,0001$).

Tra i trattamenti in condizioni di stress ossidativo, una differenza significativa è stata osservata esclusivamente tra $H_2O_2 + Imatinib$ ($82,94 \pm 4,70\%$) e $H_2O_2 + Ca074Me$ ($104,85 \pm 8,66\%$) ($p = 0,0219$). I confronti tra $H_2O_2 + Imatinib$ e $H_2O_2 + inibitore della catepsina L$ ($p = 0,0571$), nonché tra

H₂O₂ + Ca074Me e H₂O₂ + inibitore della catepsina L ($p > 0,9999$), non hanno invece raggiunto la significatività statistica.

Per quanto riguarda i trattamenti in condizioni di infiammazione, nessun confronto tra LPS + Imatinib, LPS + Ca074Me e LPS + inibitore della catepsina L ha evidenziato differenze statisticamente significative ($p = 0,9694$; $p = 0,2760$; $p = 0,9600$).

Infine, il confronto tra H₂O₂ + Imatinib ($82,94 \pm 4,70\%$) e LPS + Imatinib ($83,47 \pm 1,12\%$) non ha mostrato differenze significative ($p > 0,9999$). Al contrario, H₂O₂ + Ca074Me rispetto a LPS + Ca074Me e H₂O₂ + inibitore della catepsina L rispetto a LPS + inibitore della catepsina L hanno evidenziato una significativa riduzione della migrazione cellulare in presenza di LPS ($p = 0,0007$ e $p < 0,0001$, rispettivamente).



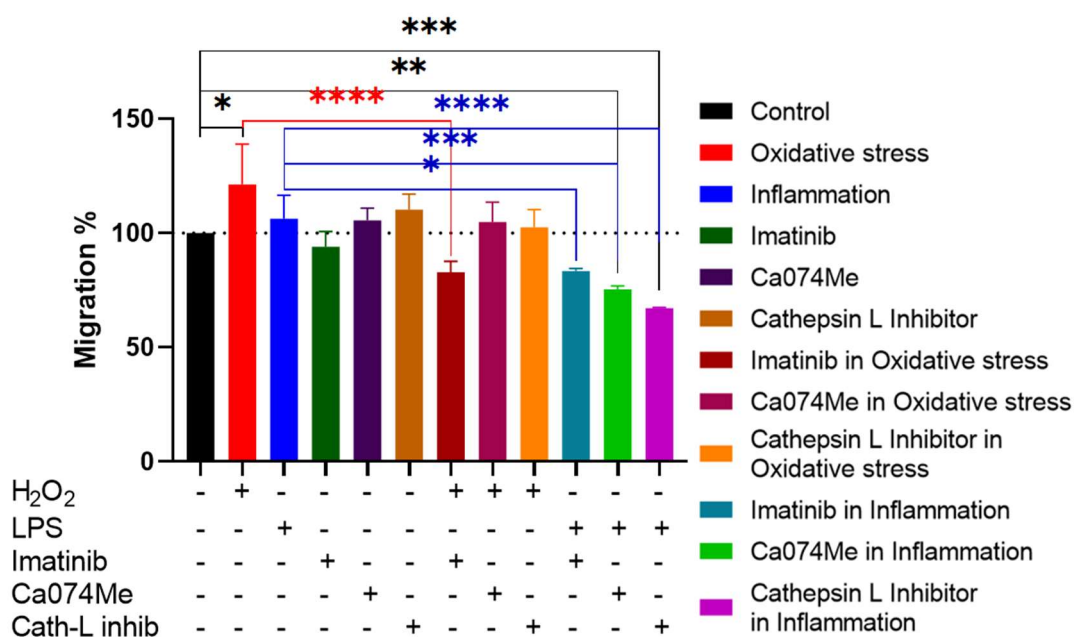


Figura 41: Migrazione cellulare in U251 nelle condizioni a) Control, b) Oxidative stress, c) Inflammation, d) Imatinib, e) Ca074Me, f) Cathepsin-L inhibitor, g) Imatinib in Oxidative stress, h) CA074Me in Oxidative stress, i) Inibitore specifico di Catepsina L in Oxidative stress, j) Imatinib in Inflammation, k) CA074Me in Inflammation, l) Inibitore specifico di Catepsina L in Inflammation.). Ingrandimento: 10X.

Sottostante è riportato l'istogramma relativo alla quantificazione della migrazione cellulare (espresso in % rispetto al controllo, linea tratteggiata = 100%) in condizioni di H₂O₂, LPS, inibitori (Imatinib, Ca074Me, inibitore di Cathepsin L) e relative combinazioni. Statistica: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

4.5 Analisi dell'attività invasiva

L'attività di invasione della linea cellulare U251 è stata valutata su un solo replicato biologico quindi i dati ottenuti sono da considerarsi preliminari.

Dai risultati si nota come la sola esposizione all'infiammazione abbia mostrato un aumento dell'invasione rispetto al controllo mentre per gli altri trattamenti singolarmente si è riscontrato un trend di diminuzione della motilità. La somministrazione degli inibitori nelle cellule esposte agli stress parrebbe indurre una riduzione della capacità di invasione, in particolare la riduzione pare essere più marcata nelle condizioni di stress ossidativo in presenza di Imatinib e nelle condizioni di stress infiammatorio in presenza degli inibitori delle catepsine B o L.

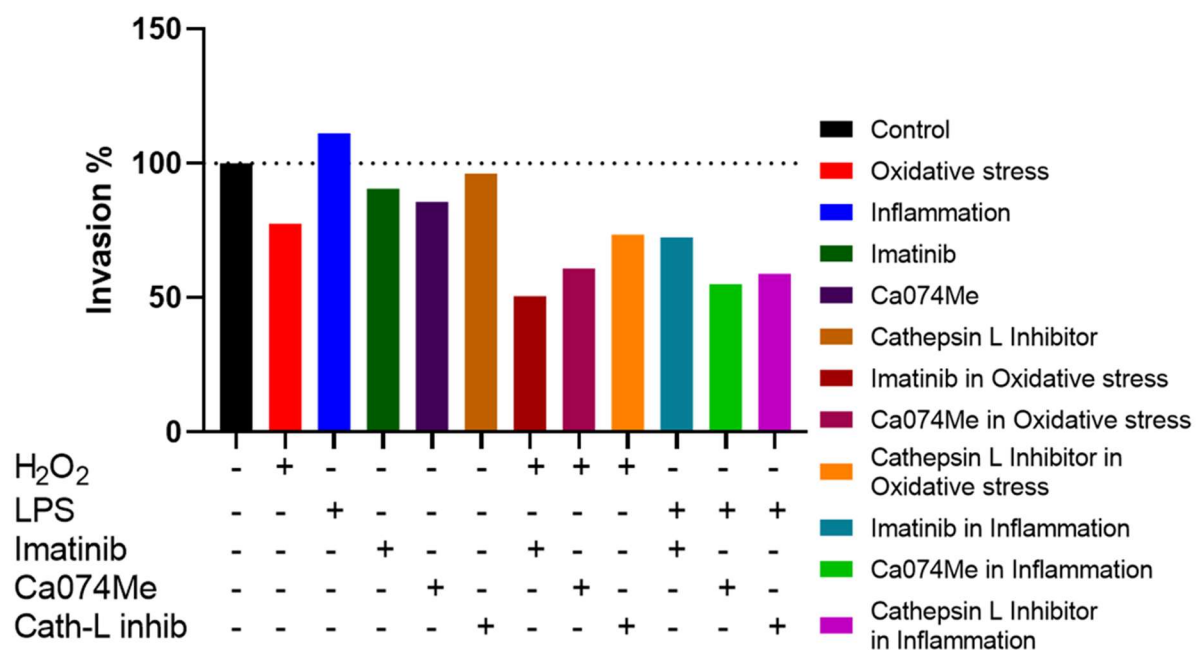


Figura 42: Instagramma relativo alla quantificazione dell'invasione cellulare in U251 in condizioni di controllo e dopo esposizione a H₂O₂, LPS, inibitori (Imatinib, Ca074Me, inibitore di Cathepsin L) e relative combinazioni.

5 DISCUSSIONE

Il glioblastoma rappresenta una delle neoplasie cerebrali più aggressive, caratterizzata da elevata capacità infiltrativa e marcata eterogeneità biologica, elementi che contribuiscono alla sua resistenza terapeutica e alla prognosi sfavorevole. Tra i diversi fattori che ne regolano la progressione, lo stress ossidativo e l'infiammazione del microambiente tumorale svolgono un ruolo centrale nel modulare i processi di migrazione e invasione cellulare.

In questo contesto, il presente lavoro si inserisce nell'analisi dei meccanismi molecolari e funzionali che regolano la motilità delle cellule di glioblastoma in risposta a stimoli ossidativi e infiammatori. In particolare, l'attenzione è stata rivolta al coinvolgimento di fattori quali PDGFR α , Catepsina B e Catepsina L nei processi di motilità e rimodellamento della matrice extracellulare.

La linea cellulare U251, utilizzata in questo studio come modello in vitro di glioblastoma umano, è stata esposta a condizioni che hanno consentito di indurre, in modo controllato, stress ossidativo o infiammatorio. Per alterare lo stato redox della coltura cellulare è stato utilizzato H₂O₂ mentre per indurre una condizione infiammatoria è stato utilizzato LPS.

Le concentrazioni di H₂O₂ e LPS così come quelle degli specifici inibitori (Imatinib, CA74Me, e Inibitore specifico di Catepsina L) sono state definite tramite esperimenti preliminari come saggio MTT e Western blot per ottenere delle condizioni riproducibili e compatibili con la vitalità della coltura cellulare. È stato così poi possibile discutere le variazioni che sono state osservate come effetti delle condizioni sperimentali e delle interazioni con i trattamenti farmacologici quali Imatinib come inibitore di PDGFR α e CA74Me e Inibitore della catepsina L rispettivamente come inibitore della catepsina B e della catepsina L.

Lo studio della vitalità cellulare tramite saggio MTT ha consentito di determinare come non si siano avute variazioni statisticamente significative dei dati in analisi alle concentrazioni di H₂O₂, LPS e trattamenti farmacologici prese in considerazione.

A livello generale è stato possibile osservare una lieve diminuzione della vitalità cellulare nel caso di trattamenti con H₂O₂ e LPS pur non raggiungendo mai la significatività statistica.

L'assenza di alterazioni rilevanti della vitalità cellulare ha rappresentato un presupposto fondamentale del presente studio. Infatti, essendo l'analisi focalizzata sui processi di migrazione e invasione cellulare, un'eventuale inibizione di tali fenomeni non potrebbe essere interpretata come un effetto biologico specifico qualora fosse riconducibile a una riduzione della vitalità o alla morte delle cellule. L'attenzione è stata quindi rivolta a marcatori molecolari coinvolti nella regolazione della migrazione cellulare. Tra questi, WFDC2 e MMP2 rappresentano due proteine strettamente associate ai processi di invasività del glioblastoma, sia per il loro ruolo nella transizione epitelio-mesenchimale sia per la capacità di promuovere il rimodellamento della matrice extracellulare.

WFDC2 è una proteina che si trova sovraespressa nel glioblastoma influenzando la crescita e la migrazione cellulare tramite la sua azione sulle vie di segnalazione che promuovono la EMT.

Nella linea cellulare U251 l'applicazione di stimoli stressori non ha portato a variazioni significative di WFDC2. Un aumento dei livelli di WFDC2 è stato però riscontrato nelle condizioni esposte a sola H_2O_2 e con significatività rispetto alla condizione di controllo in seguito al trattamento con H_2O_2 combinato all'inibizione delle catepsine. Al contrario, la condizione H_2O_2 + Imatinib ha mantenuto i livelli di WFDC2 ridotti e paragonabili a quanto riscontrato nei campioni di controllo.

I dati ottenuti in questo studio sono concordi con quanto riportato in letteratura scientifica, infatti, sono riportate evidenze sperimentali di un trend di aumento di WFDC2 in relazione allo stress ossidativo in altre linee cellulari come nel caso di modelli di tumore al seno. (Wang et al., 2021, Nowacka et al., 2025)

Questo andamento risulta particolarmente interessante considerando che WFDC2 è stata descritta come regolatore dell'attività di MMP2.

La proteina MMP2 è una metalloproteasi della matrice che interviene nel processo di migrazione cellulare nel glioblastoma. Inoltre ha anche la capacità di modulare il microambiente tumorale rilasciando di fattori di crescita, citochine e chemiochine dall'ECM.

Nel modello cellulare usato in questo studio, l'induzione di stress ossidativo ha determinato un aumento dei livelli di MMP2 rispetto alla condizione di controllo, tale aumento si è mantenuto evidente nei campioni trattati con inibitori farmacologici delle catepsine, al contrario l'inibizione di PDGFR α ha indotto una riduzione ai livelli basali di tale metalloproteasi.

A evidenza del fatto che lo stress ossidativo porti ad un aumento del segnale relativo a MMP2 la letteratura riporta che la presenza di un eccesso di ROS nell'ambiente cellulare ha un ruolo importante nella regolazione dell'attività delle MMP all'interno della cellula. Le specie reattive dell'ossigeno, infatti, sono in grado di attivare le MMP tramite ossidazione inducendone cambiamenti conformazionali e conseguente attivazione. (Bassiouni et al., 2021)

Alla luce di queste evidenze scientifiche, risulta coerente osservare che, nel presente studio, i livelli di WFDC2 e MMP2, noti per essere correlati in quanto WFDC2 promuove l'attività delle metalloproteasi della matrice attraverso la degradazione dei loro inibitori endogeni, tendono ad aumentare nelle condizioni sperimentali caratterizzate dalla presenza di stress ossidativo. (James et al., 2018)

E' però nuovo e di interesse l'effetto inibitorio esercitato da Imatinib sui livelli di tali proteine ad indicare un ruolo potenzialmente rilevante di PDGFR α nei pathway implicati nella motilità delle cellule di glioblastoma.

Le modificazioni osservate a livello molecolare hanno reso opportuno valutare se tali variazioni si traducevano anche in cambiamenti morfologici associati alla motilità cellulare. Per questo motivo è

stato analizzato il numero e la lunghezza delle protrusioni citoplasmatiche, strutture fondamentali per la migrazione delle cellule tumorali.

Il numero di protrusioni contabili sulle cellule U251 ha subito una generale diminuzione nelle condizioni considerate in questo studio.

In particolare, confrontando i campioni di controllo con quelli esposti allo stress ossidativo si è notata una diminuzione significativa del numero di protrusioni, tale diminuzione è emersa anche nei campioni esposti agli inibitori farmacologici. Al contrario, in queste stesse condizioni si è registrato un aumento, anche se non significativo, della loro lunghezza.

Seppur sia da notare che tali conclusioni siano preliminari e che la grande variabilità morfologica che caratterizza la linea qui utilizzata limiti l'efficacia di queste osservazioni, i nostri dati suggeriscono come l'esposizione allo stress ossidativo, che sia da solo o anche in presenza di altri trattamenti, porti ad una diminuzione più marcata del numero di protrusioni ed a un aumento della loro lunghezza rispetto alle altre condizioni considerate.

Nel complesso, questi risultati sono coerenti con quanto riportato in letteratura, secondo cui condizioni di stress ossidativo e l'esposizione a specifici trattamenti farmacologici possono determinare un rimodellamento del citoscheletro e delle protrusioni citoplasmatiche, influenzando la capacità migratoria delle cellule tumorali. Inoltre, l'analisi congiunta dei parametri morfologici e molecolari evidenzia un quadro biologicamente coerente: nelle condizioni di stress ossidativo, la riduzione del numero di protrusioni è accompagnata da una tendenza al loro allungamento e da un aumento dell'espressione di WFDC2 e MMP2, due marcatori associati a un fenotipo più invasivo. È quindi plausibile ipotizzare che le cellule, pur formando un numero inferiore di protrusioni, sviluppino strutture più estese e funzionalmente più efficienti nel sostenere la migrazione. Sebbene tale interpretazione richieda ulteriori conferme sperimentali, essa risulta in accordo con il complessivo profilo pro-migratorio osservato nelle condizioni di stress ossidativo.

Le variazioni osservate nell'espressione di WFDC2 e MMP2 suggerivano possibili ripercussioni funzionali sulla capacità migratoria delle cellule. Per verificare tale ipotesi sono stati eseguiti i saggi di migrazione e invasione.

I processi di migrazione e invasione, quindi la motilità cellulare, sono aspetti importanti da considerare nel contesto di una cellula tumorale dato che sono alla base dell'aggressività del tumore. L'analisi della migrazione cellulare ha evidenziato come l'esposizione allo stress ossidativo rappresenti la condizione sperimentale maggiormente in grado di promuovere la motilità delle cellule U251. In particolare, il trattamento con H_2O_2 ha determinato un incremento statisticamente significativo della migrazione rispetto al controllo, mentre l'esposizione a LPS ha mostrato solamente una lieve tendenza all'aumento, priva di significatività statistica.

L'effetto pro-migratorio indotto dallo stress ossidativo è risultato parzialmente attenuato dal trattamento con Imatinib. Infatti, mentre la combinazione di H₂O₂ con gli inibitori delle catepsine B e L ha mantenuto una tendenza all'aumento della migrazione, l'associazione H₂O₂ + Imatinib ha determinato una riduzione della capacità migratoria rispetto alla condizione di solo stress ossidativo. Questo andamento suggerisce che l'inibizione di PDGFR α possa limitare gli effetti pro-migratori indotti dai ROS.

Questi risultati sono in linea con quanto osservato nelle analisi molecolari. Infatti, l'aumento della migrazione nelle cellule esposte a H₂O₂ è accompagnato da una maggiore espressione di WFDC2 e MMP2, entrambe riconosciute in letteratura come molecole coinvolte nella promozione della migrazione e dell'invasività del glioblastoma. Nel complesso, i dati ottenuti rafforzano quindi l'ipotesi che lo stress ossidativo favorisca l'acquisizione di un fenotipo pro-migratorio attraverso l'attivazione di pathway molecolari associati alla motilità cellulare.

Un andamento differente è emerso nelle condizioni pro-infiammatorie. Sebbene il solo trattamento con LPS non abbia modificato significativamente la migrazione, la combinazione con gli inibitori della catepsina B (CA074Me) e della catepsina L ha determinato una riduzione significativa della capacità migratoria. Questo risultato suggerisce un possibile coinvolgimento delle catepsine nel sostenere la motilità cellulare in presenza di uno stimolo infiammatorio. È noto, infatti, che durante l'infiammazione questi enzimi vengono espressi e secreti in quantità maggiori, contribuendo alla degradazione della matrice extracellulare e facilitando la migrazione delle cellule tumorali (Mitrović et al., 2017)

La loro inibizione potrebbe quindi ostacolare il rimodellamento dell'ECM e limitare l'attivazione dei pathway necessari alla motilità cellulare. (Victor et al., 2011)

Per quanto riguarda l'invasione cellulare, i dati disponibili, pur derivando da un solo replicato biologico, hanno mostrato un andamento complessivamente sovrapponibile a quello osservato per la migrazione. Tuttavia, in questo caso è emersa una tendenza più evidente all'aumento della capacità invasiva nelle condizioni pro-infiammatorie, suggerendo che l'infiammazione possa influenzare maggiormente i processi di invasione rispetto alla sola migrazione. Parallelamente, l'inibizione delle catepsine sembra esercitare un effetto più marcato proprio sull'invasività cellulare, rafforzando l'ipotesi di un loro ruolo chiave nel rimodellamento della matrice extracellulare durante questo processo. Poiché tali osservazioni si basano su un numero ancora limitato di replicati biologici, saranno necessari ulteriori esperimenti per confermarne la robustezza statistica e definire con maggiore precisione il contributo delle catepsine nella regolazione dell'invasione del glioblastoma.

6 CONCLUSIONI

I risultati ottenuti delineano come lo stress ossidativo e l'infiammazione modulino in modo distinto ma convergente i processi di migrazione e invasione delle cellule di glioblastoma U251.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di studiare gli effetti dello stress ossidativo, indotto mediante H_2O_2 , e dell'infiammazione, indotta con LPS, sui processi di migrazione, invasione e rimodellamento della matrice extracellulare in glioblastoma umano.

In tale contesto, sono stati considerati come principali marcatori della motilità cellulare WFDC2 e MMP2.

L'analisi è stata integrata valutando la risposta a inibitori farmacologici specifici come imatinib (per PDGFR α) e Ca074Me/inibitore di Cathepsin L (per i moduli proteolitici endo-lisosomiali quali Catepsina B e catepsina L).

I risultati hanno evidenziato un incremento dell'espressione di WFDC2 e MMP2 in condizioni di stress ossidativo, suggerendo l'attivazione di un programma molecolare associato a un fenotipo più migratorio e invasivo. Tale osservazione è risultata coerente con i dati funzionali, nei quali l'esposizione a H_2O_2 ha determinato un aumento significativo della migrazione cellulare. Inoltre, la combinazione tra stress ossidativo e Imatinib ha mostrato una riduzione dell'efficacia del trattamento rispetto alla sola condizione di stress, suggerendo un possibile coinvolgimento di PDGFR α nei meccanismi di risposta ai ROS e nella regolazione della motilità cellulare.

In condizioni pro-infiammatorie, invece, l'effetto più rilevante è emerso a livello dell'inibizione delle catepsine B e L, che ha determinato una riduzione significativa della migrazione cellulare, indicando un ruolo centrale dei processi proteolitici nel sostenere il rimodellamento della matrice extracellulare e la capacità delle cellule tumorali di adattarsi al microambiente infiammatorio. Tale evidenza è risultata ancora più marcata nell'analisi dell'invasione cellulare, dove l'infiammazione ha mostrato un impatto più evidente rispetto alla sola migrazione, suggerendo una maggiore dipendenza di questo processo dalla degradazione della matrice extracellulare.

Nel loro insieme, i dati supportano quindi l'ipotesi che lo stress ossidativo promuova principalmente la migrazione attraverso l'attivazione di pathway intracellulari associati a WFDC2 e MMP2, mentre l'infiammazione eserciti un effetto più marcato attraverso meccanismi dipendenti dal rimodellamento della matrice extracellulare mediato dalle catepsine.

Sebbene le osservazioni riportate in questo lavoro di tesi richiedano ulteriori conferme sperimentali e un ampliamento dei modelli in studio, l'insieme dei risultati fornisce una base solida per ipotizzare un'interazione complessa tra segnali redox, infiammatori e pathway proteolitici nella regolazione della progressione del glioblastoma.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Achi, J., Achi, X. W., Veintimilla, P., & Cueva, J. (2023). Unusual extraneural metastasis of glioblastoma. *Surgical Neurology International*, 14, 218. https://doi.org/10.25259/SNI_191_2023
2. Agarwal, A., Edgar, M. A., Desai, A., Gupta, V., Soni, N., & Bathla, G. (2024). Molecular GBM versus Histopathological GBM: Radiology-Pathology-Genetic Correlation and the New WHO 2021 Definition of Glioblastoma. *American Journal of Neuroradiology*, 45(8), 1006–1012. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A8225>
3. Ahir, B. K., Engelhard, H. H., & Lakka, S. S. (2020). Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Molecular Neurobiology*, 57(5), 2461–2478. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01892-8>
4. Aitchison, E. E., Dimesa, A. M., & Shoari, A. (2025). Matrix Metalloproteinases in Glioma: Drivers of Invasion and Therapeutic Targets. *BioTech*, 14(2), 28. <https://doi.org/10.3390/biotech14020028>
5. Aleid, A. M., Alrasheed, A. S., Aldanyowi, S. N., & Almalki, S. F. (2024). Advanced magnetic resonance imaging for glioblastoma: Oncology-radiology integration. *Surgical Neurology International*, 15, 309. https://doi.org/10.25259/SNI_498_2024
6. Alves, A. L. V., Gomes, I. N. F., Carloni, A. C., Rosa, M. N., da Silva, L. S., Evangelista, A. F., Reis, R. M., & Silva, V. A. O. (2021). Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02231-x>
7. Anand, N., Husain, N., Varshney, R., Malhotra, K., & Kaif, M. (2021). Molecular classification and stratification of adult diffuse gliomas: A tertiary care center study. *Journal of Carcinogenesis*, 20(1), 20. https://doi.org/10.4103/jcar.jcar_17_21
8. Andersson, N., Saba, K. H., Magnusson, L., Nilsson, J., Karlsson, J., Nord, K. H., & Gisselsson, D. (2023). Inactivation of *RBI*, *CDKN2A*, and *TP53* have distinct effects on genomic stability at side-by-side comparison in karyotypically normal cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 62(2), 93–100. <https://doi.org/10.1002/gcc.23096>
9. Andrews, L. J., Thornton, Z. A., Saincher, S. S., Yao, I. Y., Dawson, S., McGuinness, L. A., Jones, H. E., Jefferies, S., Short, S. C., Cheng, H.-Y., McAleenan, A., Higgins, J. P. T., & Kurian, K. M. (2022). Prevalence of *BRAF* V600 in glioma and use of *BRAF* Inhibitors in patients with *BRAF* V600 mutation-positive glioma: systematic review. *Neuro-Oncology*, 24(4), 528–540. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab247>

10. Antonelli, M., & Poliani, P. L. (2022). Adult type diffuse gliomas in the new 2021 WHO Classification. *Pathologica*, 114(6), 397–409. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-823>
11. Appay, R., Dehais, C., Maurage, C.-A., Alentorn, A., Carpentier, C., Colin, C., Ducray, F., Escande, F., Idhah, A., Kamoun, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Tabouret, E., Trabelsi, N., Uro-Coste, E., Delattre, J.-Y., & Figarella-Branger, D. (2019). CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz124>
12. Aslan, F., Günaydın, E., Yukruk, F., Güvenç, İ., & Gençler, O. S. (2022). Glioblastoma Multiforme With CDKN2A, Loss of PTEN and EGFR Amplification, and Diffuse Distant Organ Metastasis Treated With Six Lines of Therapy: A Case Report and Literature Review. *Cureus*, 14(4), e23796. <https://doi.org/10.7759/cureus.23796>
13. Atiya, S., Sonani, A., Eickoff, J., & Vizcaino, M. A. (2026). A left basal ganglia lesion in a 57-year-old patient. *Brain Pathology*, 36(2). <https://doi.org/10.1111/bpa.70058>
14. Bale, T. A., & Rosenblum, M. K. (2022). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: An update on pediatric low-grade gliomas and glioneuronal tumors. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 32(4), e13060. <https://doi.org/10.1111/bpa.13060>
15. Barzegar Behrooz, A., Talaie, Z., Jusheghani, F., Łos, M. J., Klonisch, T., & Ghavami, S. (2022). Wnt and PI3K/Akt/mTOR Survival Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1353. <https://doi.org/10.3390/ijms23031353>
16. Bassiouni, W., Ali, M. A. M., & Schulz, R. (2021). Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *The FEBS Journal*, 288(24), 7162–7182. <https://doi.org/10.1111/febs.15701>
17. Bayona, C., Randelović, T., & Ochoa, I. (2026). Tumor microenvironment in glioblastoma: The central role of the hypoxic–necrotic core. *Cancer Letters*, 639, 218216. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.218216>
18. Becker, A., Sells, B., Haque, S., & Chakravarti, A. (2021). Tumor Heterogeneity in Glioblastomas: From Light Microscopy to Molecular Pathology. *Cancers*, 13(4), 761. <https://doi.org/10.3390/cancers13040761>
19. Berger, T. R., Wen, P. Y., Lang-Orsini, M., & Chukwueke, U. N. (2022). World Health Organization 2021 Classification of Central Nervous System Tumors and Implications for Therapy for Adult-Type Gliomas. *JAMA Oncology*, 8(10), 1493. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.2844>
20. Bergmann, N., Delbridge, C., Gempt, J., Feuchtinger, A., Walch, A., Schirmer, L., Bunk, W., Aschenbrenner, T., Liesche-Starnecker, F., & Schlegel, J. (2020). The Intratumoral

- Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00494>
21. Biserova, K., & Strumfa, I. (2026). Glioblastoma Stem Cells and Tumour Microenvironment: Interactions Across Hypoxia, Vasculature and Immune Modulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(6), 2557. <https://doi.org/10.3390/ijms27062557>
 22. Boire, A. (2020). Metastasis to the Central Nervous System. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 26(6), 1584–1601. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000939>
 23. Borriello, L., Karagiannis, G. S., Duran, C. L., Coste, A., Oktay, M. H., Entenberg, D., & Condeelis, J. S. (2020). The role of the tumor microenvironment in tumor cell intravasation and dissemination. *European Journal of Cell Biology*, 99(6), 151098. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151098>
 24. Brösicke, N., & Faissner, A. (2015). Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhesion & Migration*, 9(1–2), 131–140. <https://doi.org/10.1080/19336918.2014.1000071>
 25. Bugakova, A. S., Chudakova, D. A., Myzina, M. S., Yanysheva, E. P., Ozerskaya, I. V., Soboleva, A. V., Baklaushev, V. P., & Yusubalieva, G. M. (2024). Non-Tumor Cells within the Tumor Microenvironment—The “Eminence Grise” of the Glioblastoma Pathogenesis and Potential Targets for Therapy. *Cells*, 13(10), 808. <https://doi.org/10.3390/cells13100808>
 26. Cela, I., Capone, E., Trevisi, G., & Sala, G. (2024). Extracellular vesicles in glioblastoma: Biomarkers and therapeutic tools. *Seminars in Cancer Biology*, 101, 25–43. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2024.04.003>
 27. Chakravarty, D., Pedraza, A. M., Cotari, J., Liu, A. H., Punko, D., Kokroo, A., Huse, J. T., Altan-Bonnet, G., & Brennan, C. W. (2017). EGFR and PDGFRA co-expression and heterodimerization in glioblastoma tumor sphere lines. *Scientific Reports*, 7(1), 9043. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08940-9>
 28. Chédeville, A. L., Lourdusamy, A., Monteiro, A. R., Hill, R., & Madureira, P. A. (2020). Investigating Glioblastoma Response to Hypoxia. *Biomedicines*, 8(9), 310. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090310>
 29. Chen, L., Rizk, E., Sherief, M., Chang, M., Lucas, C.-H., Bettegowda, C., Croog, V., Mukherjee, D., Rincon-Torroella, J., Kamson, D. O., Huang, P., Holdhoff, M., & Schreck, K. (2025). Molecular characterization of gliosarcoma reveals prognostic biomarkers and clinical parallels with glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 171(2), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s11060-024-04859-0>
 30. Crestani, M., Gerber, I., Mieville, A., Frauenknecht, K., Maragkou, T., Hortobagyi, T., & Vogel, V. (2025). Loss of Fibronectin Fiber Tension in Glioblastoma is Associated with Microvascular

- Proliferations and Immune Cell Infiltration. *Advanced Science*, 12(45). <https://doi.org/10.1002/advs.202416526>
31. Day, Z. I., Roberts-Thomson, S., Nouri, Y. J., Dalton, N. S., Wang, S. S., Davenport, A., Ludlow, L. E., Hulett, M. D., Cross, R. S., & Jenkins, M. R. (2025). Defining the extracellular matrix for targeted immunotherapy in adult and pediatric brain cancer. *Npj Precision Oncology*, 9(1), 184. <https://doi.org/10.1038/s41698-025-00956-z>
 32. De Fazio, E., Pittarello, M., Gans, A., Ghosh, B., Slika, H., Alimonti, P., & Tyler, B. (2024). Intrinsic and Microenvironmental Drivers of Glioblastoma Invasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2563. <https://doi.org/10.3390/ijms25052563>
 33. Dev, I. D., Sahay, A., Puranik, A. D., Purandare, N. C., Agrawal, A., Shah, S., Choudhury, S., Ghosh, S., & Rangarajan, V. (2024). Rare Cases of Extracranial Metastases from High-grade Glioma Detected on FET PET-CT with Histopathological Confirmation. *Indian Journal of Nuclear Medicine : IJNM : The Official Journal of the Society of Nuclear Medicine, India*, 39(3), 216–219. https://doi.org/10.4103/ijnm.ijnm_34_24
 34. Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., González-Gómez, M., García, M.-P., Díaz-Flores, L., González-Marrero, I., Ávila, J., & Martín-Vasallo, P. (2021). Disproportion in Pericyte/Endothelial Cell Proliferation and Mechanisms of Intussusceptive Angiogenesis Participate in Bizarre Vessel Formation in Glioblastoma. *Cells*, 10(10), 2625. <https://doi.org/10.3390/cells10102625>
 35. Dillon, L., & Miller, T. (2014). Therapeutic Targeting of Cancers with Loss of PTEN Function. *Current Drug Targets*, 15(1), 65–79. <https://doi.org/10.2174/1389450114666140106100909>
 36. Dmukauskas, M., Cioffi, G., Waite, K. A., Sloan, A. E., Neff, C., Price, M., Ostrom, Q. T., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2024). Sex differences in adverse events in Medicare individuals ≥ 66 years of age post glioblastoma treatment. *Journal of Neuro-Oncology*, 168(1), 111–123. <https://doi.org/10.1007/s11060-024-04652-z>
 37. Dono, A., Ramesh, A. V., Wang, E., Shah, M., Tandon, N., Ballester, L. Y., & Esquenazi, Y. (2021). The role of *RBI* alteration and 4q12 amplification in IDH-WT glioblastoma. *Neuro-Oncology Advances*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab050>
 38. Dutta, R., Sharma, M. C., Suri, V., Sarkar, C., Garg, A., Srivastava, A., & Tandon, V. (2020). Granular Cell Astrocytoma: A Diagnostic Conundrum. *World Neurosurgery*, 143, 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.07.139>
 39. Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K., Pasierbinska, M., & Kaminska, B. (2020). Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 888. <https://doi.org/10.3390/ijms21030888>
 40. Encarnación, J. A., Manso, C., Royo-Villanova, M., Ruiz, P., De la Fuente, M. I., Cárdenas, E., Ros, S., & Alonso-Romero, J. L. (2025). Incidence and Survival of IDH-Wildtype Glioblastoma

- and IDH-Mutant Astrocytoma by Treatment and Sex: A Regional Study in Spain (2011–2021). *Medical Sciences*, 13(4), 233. <https://doi.org/10.3390/medsci13040233>
41. Esemén, Y., Awan, M., Parwez, R., Baig, A., Rahman, S., Masala, I., Franchini, S., & Giakoumettis, D. (2022). Molecular Pathogenesis of Glioblastoma in Adults and Future Perspectives: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2607. <https://doi.org/10.3390/ijms23052607>
 42. Faisal, S. M., Comba, A., Varela, M. L., Argento, A. E., Brumley, E., Abel, C., Castro, M. G., & Lowenstein, P. R. (2022). The complex interactions between the cellular and non-cellular components of the brain tumor microenvironmental landscape and their therapeutic implications. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1005069>
 43. Fekete, B., Werlenius, K., Tisell, M., Pivodic, A., Smits, A., Jakola, A. S., & Rydenhag, B. (2023). What predicts survival in glioblastoma? A population-based study of changes in clinical management and outcome. *Frontiers in Surgery*, 10. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2023.1249366>
 44. Fernandes, R. T., Teixeira, G. R., Mamere, E. C., Bandeira, G. A., & Mamere, A. E. (2023). The 2021 World Health Organization classification of gliomas: an imaging approach. *Radiologia Brasileira*, 56(3), 157–161. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2022.0089-en>
 45. Filho, A. M., Znaor, A., Sunguc, C., Zahwe, M., Marcos-Gragera, R., Figueroa, J. D., & Bray, F. (2025). Cancers of the brain and central nervous system: global patterns and trends in incidence. *Journal of Neuro-Oncology*, 172(3), 567–578. <https://doi.org/10.1007/s11060-025-04944-y>
 46. Foltyn-Dumitru, M., Banan, R., Schell, M., Mahmutoglu, M. A., Kessler, T., Wick, W., Brugnara, G., Bendszus, M., Sahm, F., & Vollmuth, P. (2025). Histopathological and molecular characteristics of IDH-wildtype glioblastoma without contrast enhancement: Implications for clinical outcomes. *Neuro-Oncology*, 27(7), 1878–1887. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaf070>
 47. Frontiñán-Rubio, J., Llanos-González, E., García-Carpintero, S., Peinado, J. R., Ballesteros-Yáñez, I., Rayo, M. V., de la Fuente, J., Pérez-García, V. M., Perez-Romasanta, L. A., Malumbres, M., Alcaín, F. J., & Durán-Prado, M. (2023). CoQ10 reduces glioblastoma growth and infiltration through proteome remodeling and inhibition of angiogenesis and inflammation. *Cellular Oncology*, 46(1), 65–77. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00734-0>
 48. Gabr, M. M., AbdelHamid, S. G., Ezz El Arab, L. R., Swellam, M., & Hamdy, N. M. (2026). MGMT, NUPR1, NDRG2, and GLI1 Gene Promoter Methylation in Glioblastoma Tissues and Association with Clinical Characteristics and Therapeutic Outcomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(2), 763. <https://doi.org/10.3390/ijms27020763>

49. Guan, R., Zhang, X., & Guo, M. (2020). Glioblastoma stem cells and Wnt signaling pathway: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Chinese Neurosurgical Journal*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s41016-020-00207-z>
50. Gue, R., & Lakhani, D. A. (2024). The 2021 World Health Organization Central Nervous System Tumor Classification: The Spectrum of Diffuse Gliomas. *Biomedicines*, 12(6), 1349. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061349>
51. Guo, X., Gu, L., Li, Y., Zheng, Z., Chen, W., Wang, Y., Wang, Y., Xing, H., Shi, Y., Liu, D., Yang, T., Xia, Y., Li, J., Wu, J., Zhang, K., Liang, T., Wang, H., Liu, Q., Jin, S., ... Ma, W. (2023). Histological and molecular glioblastoma, IDH-wildtype: a real-world landscape using the 2021 WHO classification of central nervous system tumors. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1200815>
52. Guzdek, B., Fołta, K., Staniek, N., Stolarczyk, M., & Krukiewicz, K. (2025). Collagen-Based Drug Delivery Agents for Glioblastoma Multiforme Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(13), 6513. <https://doi.org/10.3390/ijms26136513>
53. Harland, A. J., & Perks, C. M. (2025). IGFBP-2 and IGF-II: Key Components of the Neural Stem Cell Niche? Implications for Glioblastoma Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4749. <https://doi.org/10.3390/ijms26104749>
54. Hsu, B.-H., Lee, W.-H., Yang, S.-T., Han, C.-T., & Tseng, Y.-Y. (2020). Spinal metastasis of glioblastoma multiforme before gliosarcomatous transformation: a case report. *BMC Neurology*, 20(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s12883-020-01768-3>
55. Huang, W.-Z., Chen, H.-C., Chang, T.-K., You, W. C., Jan, Y.-J., & Chou, Y.-C. (2024). Extracranial metastasis of pediatric glioblastoma: case report and literature review. *Child's Nervous System*, 40(3), 933–937. <https://doi.org/10.1007/s00381-023-06229-z>
56. Indeglia, A., & Murphy, M. E. (2024). Elucidating the chain of command: our current understanding of critical target genes for p53-mediated tumor suppression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 59(1–2), 128–138. <https://doi.org/10.1080/10409238.2024.2344465>
57. James, N. E., Chichester, C., & Ribeiro, J. R. (2018). Beyond the Biomarker: Understanding the Diverse Roles of Human Epididymis Protein 4 in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00124>
58. Kapteijn, M. Y., Yanovska, M., Laghmani, E. H., Postma, R. J., van Duinen, V., Ünlü, B., Queiroz, K., van Zonneveld, A. J., Versteeg, H. H., & Rondon, A. M. R. (2024). Modeling cancer-associated hypercoagulability using glioblastoma spheroids in microfluidic chips. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 8(5), 102475. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2024.102475>

59. Kato, S., Schwaederle, M., Daniels, G. A., Piccioni, D., Kesari, S., Bazhenova, L., Shimabukuro, K., Parker, B. A., Fanta, P., & Kurzrock, R. (2015). Cyclin-dependent kinase pathway aberrations in diverse malignancies: clinical and molecular characteristics. *Cell Cycle*, 14(8), 1252–1259. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1014149>
60. Kumar, P., Li, J., & Surulescu, C. (2021). Multiscale modeling of glioma pseudopalisades: contributions from the tumor microenvironment. *Journal of Mathematical Biology*, 82(6), 49. <https://doi.org/10.1007/s00285-021-01599-x>
61. Kurdi, M., Baesa, S., Okal, F., Bamaga, A. K., Faizo, E., Fathaddin, A. A., Alkhotani, A., Karami, M. M., & Bahakeem, B. (2023). Extracranial metastasis of brain glioblastoma outside CNS: Pathogenesis revisited. *Cancer Reports (Hoboken, N.J.)*, 6(12), e1905. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1905>
62. Kwon, H., Yun, M., Kwon, T.-H., Bang, M., Lee, J., Lee, Y. S., Ko, H. Y., & Chong, K. (2023). Fibronectin Type III Domain Containing 3B as a Potential Prognostic and Therapeutic Biomarker for Glioblastoma. *Biomedicines*, 11(12), 3168. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123168>
63. Li, J., Shih, L.-K., Markwell, S. M., Olson, C. L., Sullivan, D. P., Arvanitis, C., Ross, J. L., Lam, N. G., Nuszen, H., Hambardzumyan, D., Becher, O. J., & Brat, D. J. (2025). A clinically relevant model and method to study necrosis as a driving force in glioma restructuring and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.2416024122>
64. Li, L., Dutra, A., Pak, E., Labrie, J. E., Gerstein, R. M., Pandolfi, P. P., Recht, L. D., & Ross, A. H. (2009). EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. *Neuro-Oncology*, 11(1), 9–21. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-081>
65. Lipková, J., Menze, B., Wiestler, B., Koumoutsakos, P., & Lowengrub, J. S. (2022). Modelling glioma progression, mass effect and intracranial pressure in patient anatomy. *Journal of The Royal Society Interface*, 19(188). <https://doi.org/10.1098/rsif.2021.0922>
66. Li, Q., Li, Z., Luo, T., & Shi, H. (2022). Targeting the PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK pathways for cancer therapy. *Molecular Biomedicine*, 3(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00110-2>
67. Li, S., Wang, C., Chen, J., Lan, Y., Zhang, W., Kang, Z., Zheng, Y., Zhang, R., Yu, J., & Li, W. (2023). Signaling pathways in brain tumors and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01260-z>
68. Liu, J., Shen, L., Tang, G., Tang, S., Kuang, W., Li, H., Tian, Y., & Zhou, Q. (2020). Multiple extracranial metastases from glioblastoma multiforme: a case report and literature review. *Journal of International Medical Research*, 48(6). <https://doi.org/10.1177/0300060520930459>

69. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
70. Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
71. Malhotra, J., Mambetsariev, I., Gilmore, G., Fricke, J., Nam, A., Gallego, N., Chen, B. T., Chen, M., Amini, A., Lukas, R. V., & Salgia, R. (2025). Targeting CNS Metastases in Non–Small Cell Lung Cancer With Evolving Approaches Using Molecular Markers. *JAMA Oncology*, 11(1), 60. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2024.5218>
72. Mangiola, A., de Bonis, P., Maira, G., Balducci, M., Sica, G., Lama, G., Lauriola, L., & Anile, C. (2008). Invasive tumor cells and prognosis in a selected population of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*, 113(4), 841–846. <https://doi.org/10.1002/cncr.23624>
73. Ma, S., Pan, X., Gan, J., Guo, X., He, J., Hu, H., Wang, Y., Ning, S., & Zhi, H. (2024). DNA methylation heterogeneity attributable to a complex tumor immune microenvironment prompts prognostic risk in glioma. *Epigenetics*, 19(1). <https://doi.org/10.1080/15592294.2024.2318506>
74. Mezzacappa, F. M., & Thorell, W. (2026). *Neuronal Brain Tumors*.
75. Michalska-Foryszewska, A., Bujko, M., Kwiatkowska-Miernik, A., Ziemba, K., Sklinda, K., Walecki, J., & Mruk, B. (2024). The peritumoral brain zone in glioblastoma: a review of the pretreatment approach. *Polish Journal of Radiology*, 89, 480–487. <https://doi.org/10.5114/pjr/192044>
76. Mitrović, A., Pečar Fonović, U., & Kos, J. (2017). Cysteine cathepsins B and X promote epithelial-mesenchymal transition of tumor cells. *European Journal of Cell Biology*, 96(6), 622–631. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.04.003>
77. Mourad, P. D., Farrell, L., Stamps, L. D., Chicoine, M. R., & Silbergeld, D. L. (2005). Why are systemic glioblastoma metastases rare? Systemic and cerebral growth of mouse glioblastoma. *Surgical Neurology*, 63(6), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2004.08.062>
78. Myers, B. L., Brayer, K. J., Paez-Beltran, L. E., Villicana, E., Keith, M. S., Suzuki, H., Newville, J., Anderson, R. H., Lo, Y., Mertz, C. M., Kollipara, R. K., Borromeo, M. D., Lu, Q. R., Bachoo, R. M., Johnson, J. E., & Vue, T. Y. (2024). Transcription factors ASCL1 and OLIG2 drive glioblastoma initiation and co-regulate tumor cell types and migration. *Nature Communications*, 15(1), 10363. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54750-9>

79. Nam, D.-H., Lee, J.-K., Joo, K. M., Lee, J., & Yoon, Y. (2014). Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *OncoTargets and Therapy*, 1933. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36582>
80. Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
81. Noushmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., Van Den Berg, D., Shen, H., ... Aldape, K. (2010). Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*, 17(5), 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>
82. Nowacka, A., Śniegocki, M., & Ziółkowska, E. (2025a). Oxidative Stress and Antioxidants in Glioblastoma: Mechanisms of Action, Therapeutic Effects and Future Directions. *Antioxidants*, 14(9), 1121. <https://doi.org/10.3390/antiox14091121>
83. Nowacka, A., Śniegocki, M., & Ziółkowska, E. (2025b). Oxidative Stress and Antioxidants in Glioblastoma: Mechanisms of Action, Therapeutic Effects and Future Directions. *Antioxidants*, 14(9), 1121. <https://doi.org/10.3390/antiox14091121>
84. Omuro, A. (2013). Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *JAMA*, 310(17), 1842. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
85. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro-Oncology*, 23(Supplement_3), iii1–iii105. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab200>
86. Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2023). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020. *Neuro-Oncology*, 25(Supplement_4), iv1–iv99. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noad149>
87. Pan, Z., Zhang, S., Cen, S., Hou, C., Li, M., Ye, J., & Hu, J. (2025). The association between allergy and risk of brain tumors: Evidence from 40 observational studies. *Acta Neurochirurgica*, 167(1), 111. <https://doi.org/10.1007/s00701-025-06499-3>
88. PERAUD, A., WATANABE, K., PLATE, K. H., YONEKAWA, Y., KLEIHUES, P., & OHGAKI, H. (1997). p53 Mutations versus EGF Receptor Expression in Giant Cell

- Glioblastomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(11), 1236–1241. <https://doi.org/10.1097/00005072-199711000-00008>
89. Percuoco, V., Herlin, E., Prada, F., Riva, M., Pessina, F., Staartjes, V. E., Della Pepa, G. M., & Menna, G. (2024). Glioblastoma invasion patterns from a clinical perspective—a systematic review. *Neurosurgical Review*, 47(1), 864. <https://doi.org/10.1007/s10143-024-02944-6>
 90. Pibuel, M. A., Poodts, D., Díaz, M., Hajos, S. E., & Lompardía, S. L. (2021). The scrambled story between hyaluronan and glioblastoma. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100549. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100549>
 91. Pouyan, A., Ghorbanlo, M., Eslami, M., Jahanshahi, M., Ziaei, E., Salami, A., Mokhtari, K., Shahpasand, K., Farahani, N., Meybodi, T. E., Entezari, M., Taheriazam, A., Hushmandi, K., & Hashemi, M. (2025). Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. *Molecular Cancer*, 24(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02267-0>
 92. Qian, Y., Ma, Z., Xu, Z., Duan, Y., Xiong, Y., Xia, R., Zhu, X., Zhang, Z., Tian, X., Yin, H., Liu, J., Song, J., Lu, Y., Zhang, A., Guo, C., Jin, L., Kim, W. J., Ke, J., Xu, F., ... He, Y. (2024). Structural basis of Frizzled 4 in recognition of Dishevelled 2 unveils mechanism of WNT signaling activation. *Nature Communications*, 15(1), 7644. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52174-z>
 93. Qin, K., Yu, M., Fan, J., Wang, H., Zhao, P., Zhao, G., Zeng, W., Chen, C., Wang, Y., Wang, A., Schwartz, Z., Hong, J., Song, L., Wagstaff, W., Haydon, R. C., Luu, H. H., Ho, S. H., Strelzow, J., Reid, R. R., ... Shi, L. L. (2024). Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes & Diseases*, 11(1), 103–134. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.01.030>
 94. Ramar, V., Guo, S., Wang, G., & Liu, M. (2025). The Pivotal Role of NF-κB in Glioblastoma: Mechanisms of Activation and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(16), 7883. <https://doi.org/10.3390/ijms26167883>
 95. Read, R. D., Tapp, Z. M., Rajappa, P., & Hambardzumyan, D. (2024). Glioblastoma microenvironment—from biology to therapy. *Genes & Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.351427.123>
 96. Roda, D., Veiga, P., Melo, J. B., Carreira, I. M., & Ribeiro, I. P. (2024). Principles in the Management of Glioblastoma. *Genes*, 15(4), 501. <https://doi.org/10.3390/genes15040501>
 97. Roda, E., & Bottone, M. G. (2022). Editorial: Brain Cancers: New Perspectives and Therapies. *Frontiers in Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.857408>

98. Rossi, J., Zedde, M., Napoli, M., Pascarella, R., Pisanello, A., Biagini, G., & Valzania, F. (2024). Impact of Sex Hormones on Glioblastoma: Sex-Related Differences and Neuroradiological Insights. *Life*, 14(12), 1523. <https://doi.org/10.3390/life14121523>
99. Rubin, S. M., Sage, J., & Skotheim, J. M. (2020). Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Molecular Cell*, 80(2), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.020>
100. Rubin, S. M., Sage, J., & Skotheim, J. M. (2026). Emerging Strategies to Inhibit the G1/S Transition for Cancer Therapy. *Cancer Research*, 86(7), 1545–1557. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-25-0916>
101. Saavedra-López, E., Roig-Martínez, M., Cribaro, G. P., Casanova, P. V, Gallego, J. M., Pérez-Vallés, A., & Barcia, C. (2020). Phagocytic glioblastoma-associated microglia and macrophages populate invading pseudopalisades. *Brain Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcz043>
102. Salari, N., Ghasemi, H., Fatahian, R., Mansouri, K., Dokaneheifard, S., Shiri, M. H., Hemmati, M., & Mohammadi, M. (2023). The global prevalence of primary central nervous system tumors: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01011-y>
103. Sati, I. S. E. E., & Parhar, I. (2021). MicroRNAs Regulate Cell Cycle and Cell Death Pathways in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13550. <https://doi.org/10.3390/ijms222413550>
104. Schaff, L. R., & Mellinghoff, I. K. (2023). Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults. *JAMA*, 329(7), 574. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>
105. Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., Corona, C., & Mellai, M. (2018). Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers*, 11(1), 5. <https://doi.org/10.3390/cancers11010005>
106. Seker-Polat, F., Pinarbasi Degirmenci, N., Solaroglu, I., & Bagci-Onder, T. (2022). Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers*, 14(2), 443. <https://doi.org/10.3390/cancers14020443>
107. Sipos, D., Raposa, B. L., Freihat, O., Simon, M., Mekis, N., Cornacchione, P., & Kovács, Á. (2025). Glioblastoma: Clinical Presentation, Multidisciplinary Management, and Long-Term Outcomes. *Cancers*, 17(1), 146. <https://doi.org/10.3390/cancers17010146>
108. Sloan, A. R., Silver, D. J., Kint, S., Gallo, M., & Lathia, J. D. (2024). Cancer stem cell hypothesis 2.0 in glioblastoma: Where are we now and where are we going? *Neuro-Oncology*, 26(5), 785–795. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae011>

109. Smith, C. J., Perfetti, T. A., Chokshi, C., Venugopal, C., Ashford, J. W., & Singh, S. K. (2024). Risk factors for glioblastoma are shared by other brain tumor types. *Human & Experimental Toxicology*, 43. <https://doi.org/10.1177/09603271241241796>
110. Smith, H. L., Wadhvani, N., & Horbinski, C. (2022). Major Features of the 2021 WHO Classification of CNS Tumors. *Neurotherapeutics*, 19(6), 1691–1704. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01249-0>
111. Steed, T. C., Treiber, J. M., Patel, K., Ramakrishnan, V., Merk, A., Smith, A. R., Carter, B. S., Dale, A. M., Chow, L. M. L., & Chen, C. C. (2016). Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. *Oncotarget*, 7(18), 24899–24907. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8551>
112. Sun, T., Patil, R., Galstyan, A., Klymyshyn, D., Ding, H., Chesnokova, A., Cavenee, W. K., Furnari, F. B., Ljubimov, V. A., Shatalova, E. S., Wagner, S., Li, D., Mamelak, A. N., Bannykh, S. I., Patil, C. G., Rudnick, J. D., Hu, J., Grodzinski, Z. B., Rekechenetskiy, A., ... Ljubimova, J. Y. (2019). Blockade of a Laminin-411–Notch Axis with CRISPR/Cas9 or a Nanobioconjugate Inhibits Glioblastoma Growth through Tumor-Microenvironment Cross-talk. *Cancer Research*, 79(6), 1239–1251. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2725>
113. Tang, X., Zuo, C., Fang, P., Liu, G., Qiu, Y., Huang, Y., & Tang, R. (2021). Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.701291>
114. Tataranu, L. G. (2025). Liquid Biopsy as a Diagnostic and Monitoring Tool in Glioblastoma. *Medicina*, 61(4), 716. <https://doi.org/10.3390/medicina61040716>
115. Tomoszková, S., Škarda, J., & Lipina, R. (2024). Potential Diagnostic and Clinical Significance of Selected Genetic Alterations in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4438. <https://doi.org/10.3390/ijms25084438>
116. Torp, S. H., Solheim, O., & Skjulsvik, A. J. (2022). The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochirurgica*, 164(9), 2453–2464. <https://doi.org/10.1007/s00701-022-05301-y>
117. Tu, J., Shen, C., Liu, J., Hu, B., Chen, Z., Yan, Y., Li, C., Xiong, J., Daoud, A. M., Wang, X., Li, Y., & Zhu, F. (2025). Detection of Microscopic Glioblastoma Infiltration in Peritumoral Edema Using Interactive Deep Learning With <sc>DTI</sc> Biomarkers: Testing via Stereotactic Biopsy. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 62(6), 1802–1811. <https://doi.org/10.1002/jmri.70058>

118. Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Review Glioblastoma multiforme – an overview. *Współczesna Onkologia*, 5, 307–312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
119. Valenzuela-Fuenzalida, J. J., Moyano-Valarezo, L., Silva-Bravo, V., Milos-Brandenberg, D., Orellana-Donoso, M., Nova-Baeza, P., Suazo-Santibáñez, A., Rodríguez-Luengo, M., Oyanedel-Amaro, G., Sanchis-Gimeno, J., & Gutiérrez Espinoza, H. (2024). Association between the Anatomical Location of Glioblastoma and Its Evaluation with Clinical Considerations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 13(12), 3460. <https://doi.org/10.3390/jcm13123460>
120. Valor, L. M., & Hervás-Corpión, I. (2020). The Epigenetics of Glioma Stem Cells: A Brief Overview. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.602378>
121. Venkataramani, V., Yang, Y., Schubert, M. C., Reyhan, E., Tetzlaff, S. K., Wißmann, N., Botz, M., Soyka, S. J., Beretta, C. A., Pramatarov, R. L., Fankhauser, L., Garofano, L., Freudenberg, A., Wagner, J., Tanev, D. I., Ratliff, M., Xie, R., Kessler, T., Hoffmann, D. C., ... Winkler, F. (2022). Glioblastoma hijacks neuronal mechanisms for brain invasion. *Cell*, 185(16), 2899–2917.e31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.054>
122. Victor, B. C., Anbalagan, A., Mohamed, M. M., Sloane, B. F., & Cavallo-Medved, D. (2011). Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion. *Breast Cancer Research*, 13(6), R115. <https://doi.org/10.1186/bcr3058>
123. Virtuoso, A., D’Amico, G., Scalia, F., De Luca, C., Papa, M., Maugeri, G., D’Agata, V., Caruso Bavisotto, C., & D’Amico, A. G. (2024). The Interplay between Glioblastoma Cells and Tumor Microenvironment: New Perspectives for Early Diagnosis and Targeted Cancer Therapy. *Brain Sciences*, 14(4), 331. <https://doi.org/10.3390/brainsci14040331>
124. Wang, L., Hu, N., Jiang, Z., Luo, P., Yi, N., Chen, Y., Zhou, N., & Liu, L. (2021). Association Between Serum Human Epididymis Protein 4 Levels and Cardiovascular Events in Obese Patients with Breast Cancer. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, Volume 14, 3703–3710. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S320122>
125. Wanleenuwat, P., & Iwanowski, P. (2020). Metastases to the central nervous system: Molecular basis and clinical considerations. *Journal of the Neurological Sciences*, 412, 116755. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116755>
126. Weller, M., Wen, P. Y., Chang, S. M., Dirven, L., Lim, M., Monje, M., & Reifenberger, G. (2024). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00516-y>

127. Wen, P. Y., & Packer, R. J. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: clinical implications. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1215–1217. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab120>
128. Whitfield, B. T., & Huse, J. T. (2022). Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology*, 32(4). <https://doi.org/10.1111/bpa.13062>
129. Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K. J., & Werb, Z. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nature Communications*, 11(1), 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>
130. Xu, C., Hou, P., Li, X., Xiao, M., Zhang, Z., Li, Z., Xu, J., Liu, G., Tan, Y., & Fang, C. (2024). Comprehensive understanding of glioblastoma molecular phenotypes: classification, characteristics, and transition. *Cancer Biology & Medicine*, 1–19. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0510>
131. Yabo, Y. A., & Heiland, D. H. (2024). Understanding glioblastoma at the single-cell level: Recent advances and future challenges. *PLOS Biology*, 22(5), e3002640. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002640>
132. Yekula, A., Yekula, A., Muralidharan, K., Kang, K., Carter, B. S., & Balaj, L. (2020). Extracellular Vesicles in Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03137>
133. Yu, M., Qin, K., Fan, J., Zhao, G., Zhao, P., Zeng, W., Chen, C., Wang, A., Wang, Y., Zhong, J., Zhu, Y., Wagstaff, W., Haydon, R. C., Luu, H. H., Ho, S., Lee, M. J., Strelzow, J., Reid, R. R., & He, T.-C. (2024). The evolving roles of Wnt signaling in stem cell proliferation and differentiation, the development of human diseases, and therapeutic opportunities. *Genes & Diseases*, 11(3), 101026. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.04.042>
134. Zaman, F. Y., McLean, C., & Ameratunga, M. (2022). Dramatic clinical response in the treatment of small cell glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 47(6), 832–834. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13608>
135. Zhang, J., Chen, Y., & Xu, H. (2025). Glioblastoma induces CAF-like astrocyte activation via the AKT/mTOR–SERPINH1/COL5A1 axis. *Biomolecules and Biomedicine*, 25(12), 2737–2754. <https://doi.org/10.17305/bb.2025.11898>
136. Zhang, N., & Li, Y. (2023). Receptor tyrosine kinases: biological functions and anticancer targeted therapy. *MedComm*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/mco2.446>
137. Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R. (2018).

The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*, 10(9), 297.
<https://doi.org/10.3390/cancers10090297>

138. Zheng, B., Han, Y., & Zhang, H. (2025). Role of matrix metalloproteinases in the invasion of glioblastoma and drug interventions (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 57(2), 1–17. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2025.5704>