

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Ruolo dello scambiatore sodio-calcio NCX1 in modelli 2D e 3D
di glioblastoma multiforme

Relatore:

Prof.ssa Paola Rossi

Correlatore:

Dott.ssa Francesca Giammello

Tesi Sperimentale di

Adriana Maria Distefano

Anno Accademico 2025/2026

RIASSUNTO

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore cerebrale più aggressivo e frequente nell'uomo, classificato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come glioma di grado IV. Questo tumore è caratterizzato da un'elevata capacità proliferativa e infiltrativa nel parenchima cerebrale circostante, che contribuisce alla progressione tumorale e ad un elevato tasso di recidiva, che lo rende resistente ai trattamenti terapeutici standard, che combinano chirurgia, radioterapia e chemioterapia con Temozolomide (TMZ). Negli ultimi anni, vari studi hanno evidenziato il coinvolgimento dei canali ionici e dei trasportati di membrana nella regolazione della migrazione e invasione cellulare, tra cui lo scambiatore sodio/calcio NCX1, fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi del calcio intracellulare. Il ruolo di NCX1 nella regolazione della migrazione in GBM è stato dimostrato in una linea cellulare immortalizzata (U251), appartenente al sottotipo classico.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di approfondire il ruolo di NCX1 nella migrazione cellulare e nei fenomeni associati al mimetismo vascolare utilizzando le cellule primarie di glioblastoma umano GBM19, di origine mesenchimale, un modello più rappresentativo dell'eterogeneità tumorale rispetto alle linee immortalizzate U251, e appartenente al sottotipo di GBM maggiormente aggressivo.

Per il presente studio sono state impiegate diverse tecniche sperimentali in modo complementare, combinando il *wound-healing assay* con l'osservazione mediante microscopia ottica in campo chiaro, microscopia a fluorescenza e microscopia *time-lapse*. Inoltre, sono state allestite e analizzate colture cellulari tridimensionali, con particolare attenzione alla generazione e caratterizzazione di sferoidi tumorali, al fine di riprodurre in maniera più fedele l'architettura del tumore *in vivo*.

Per indagare il ruolo funzionale di NCX1 nelle GBM19, è stato analizzato l'effetto del bepridil, un bloccante farmacologico specifico di NCX1, sulla vitalità, sulla migrazione e sulla capacità invasiva delle cellule.

I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza di due diverse popolazioni cellulari sul fronte migratorio osservato in seguito a generazione di uno *scratch*: le *loop cells*, che derivano dalla formazione spontanea di strutture cellulari ad anello, associate un'elevata espressione di *Ve-cadherin*, marcatore coinvolto nella *vasculogenic mimicry* (VM), e le *leading-edge cells*, caratterizzate da morfologia allungata e presenza di protrusioni citoplasmatiche orientate lungo la direzione migratoria.

L'analisi di immunofluorescenza ha mostrato un'aumentata espressione di NCX1 nelle cellule localizzate sul fronte migratorio rispetto alle cellule che si trovano lontano dallo *scratch*, chiamate *extra cells*.

L'inibizione di NCX1 mediante bepridil ha determinato una riduzione della capacità migratoria delle GBM19. Nel wound-healing assay, le cellule in condizioni di controllo erano in grado di chiudere completamente lo scratch dopo circa 40 h, mentre le cellule trattate con bepridil mostravano un rallentamento della migrazione, senza completare la chiusura della ferita. Inoltre, il trattamento con bepridil ha determinato un'alterazione della capacità delle GBM19 di formare i loops associati alla VM.

Per validare il ruolo di NCX1 in un modello sperimentale tridimensionale, sono stati infine ottenuti sferoidi tumorali di GBM19 come modello sperimentale che più rassomiglia la struttura tumorale. In condizioni di controllo, gli sferoidi mostravano una progressiva crescita con la formazione di prolungamenti cellulari invasivi, con aumento della lunghezza e dell'area di invasione. Al contrario, gli sferoidi trattati con bepridil presentavano una crescita più limitata, una ridotta formazione di protrusioni cellulari e una diminuzione sia della lunghezza sia dell'area invasiva rispetto al controllo. Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano il coinvolgimento di NCX1 nei processi di migrazione, di invasione e di organizzazione strutturale associata ai fenomeni di mimetismo vascolare nel glioblastoma mesenchimale. Tali evidenze sostengono NCX1 come potenziale target nel GBM e pongono le basi per futuri studi volti allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 ORIGINE DEL GLIOMA	3
1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)	4
1.3 MARCATORI MOLECOLARI DEL GLIOBLASTOMA	5
1.3.1 MGMT	6
1.3.2 EGFR	6
1.3.3 IDH 1/2	7
1.3.4 TERT	7
1.3.5 TP53	7
1.3.6 VEGF	8
1.3.7 ATRX	8
1.4 SOTTOTIPI DI GBM	9
1.5 CELLULE STAMINALI DEL GLIOBLASTOMA (GSCs)	10
1.5.1 TRATTAMENTI TERAPEUTICI DEL GBM	10
1.5.2 LIMITAZIONI TERAPEUTICHE DEL GBM	11
1.6 LINEE CELLULARI DI GBM	12
1.6.1 CELLULE IMMORTALIZZATE	12
1.6.2 CELLULE PRIMARIE	13
1.7 VASCULARIZZAZIONE TUMORALE E VASCULOGENIC MIMICRY	13
1.7.1 VASCULARIZZAZIONE TUMORALE E ANGIOGENESI	13
1.7.2 MECCANISMI ALTERNATIVI DI VASCULARIZZAZIONE TUMORALE	14
1.7.3 VASCUOGENIC MIMICRY	14
1.7.4 MARCATORI MOLECOLARI DELLA VM	15
1.7.5 MICROAMBIENTE TUMORALE E VM	16
1.8 MIGRAZIONE CELLULARE NEL GLIOBLASTOMA	16
1.9 RUOLO DEI CANALI IONICI NELLA MIGRAZIONE CELLULARE	17
1.9.1 CANALI IONICI NEL GBM	18
1.10 LO SCAMBIATORE $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	18
1.11 GLI SFEROIDI COME MODELLO TUMORALE TRIDIMENSIONALE <i>IN VITRO</i>	20
2. SCOPO	22
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 COLTURA CELLULARE DI GLIOBLASTOMA UMANO (GBM19)	23
3.2 PASSAGGIO CELLULARE	24
3.3 CONTEGGIO CELLULARE	24
3.4 CONGELAMENTO DELLE CELLULE	25
3.5 SCONGELAMENTO DELLE CELLULE	25
3.6 FISSAZIONE DELLE CELLULE	26
3.7 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA-EOSINA	26
3.8 MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE	26
3.9 SAGGIO DELL'MTT	27
3.10 SAGGIO DEL <i>WOUND-HEALING</i> E MICROSCOPIA <i>TIME-LAPSE</i>	28
3.11 ANALISI <i>TIME-LAPSE</i>	30
3.12 IMMUNOFLUORESCENZA	31

3.13	SFEROIDI	32
3.14	ANALISI STATISTICHE	33
4.	RISULTATI	34
4.1	FORMAZIONE DI STRUTTURE VASCULOGENIC MIMICRY-LIKE NELLE CELLULE GBM19	34
4.2	IL FRONTE MIGRATORIO DELLE GBM19 È CARATTERIZZATO DALLA PRESENZA DI CELLULE LEADING-EDGE E LOOP	35
4.3	VE-CADHERIN E VINCULIN SONO ESPRESSE DIFFERENZIALMENTE NELLE CELLULE GBM19 LOOP E LEADING-EDGE	38
4.4	LA PROTEINA NCX1 È ESPRESSA SULLA MEMBRANA CELLULARE DELLE CELLULE GBM19 LOCALIZZATE SUL FRONTE MIGRATORIO	40
4.5	L'INIBIZIONE DI NCX1 BLOCCA LA MIGRAZIONE DELLE CELLULE GBM19 E NE ALTERA L'ORIENTAMENTO DIREZIONALE	41
4.6	L'INIBIZIONE DI NCX1 ALTERA LA FORMAZIONE E LA CHIUSURA DEI LOOPS DURANTE LA MIGRAZIONE DELLE GBM19	44
4.7	L'INIBIZIONE DI NCX1 RIDUCE LA CRESCITA E L'INVASIONE DEGLI SFEROIDI TUMORALI	46
5.	DISCUSSIONE	48
6.	CONCLUSIONI	51
7.	BIBLIOGRAFIA	52

1. INTRODUZIONE

1.1 ORIGINE DEL GLIOMA

I Gliomi rappresentano il gruppo più comune di tumori primitivi del sistema nervoso centrale (SNC) e originano dalle cellule gliali, tra cui astrociti, oligodendrociti o loro precursori. Rappresentano circa il 30-50% di tutte le neoplasie intracraniche, con un'incidenza annua di 5-6 casi per 100.000 abitanti e una predominanza negli individui tra i 45 e i 65 anni, di sesso maschile (Dai & Holland, 2001).

La loro aggressività deriva da un elevato tasso di proliferazione e dalla marcata invasività nel tessuto cerebrale circostante. La crescita del tumore comporta compressione del parenchima sano e alterazioni del microambiente, inducendo ipossia locale, stress ossidativo e necrosi neuronale. Inoltre, un aumentato rilascio di glutammato da parte delle cellule tumorali può determinare lo squilibrio glutammatergico con eccitotossicità, un fenomeno di tossicità cellulare, responsabili di sintomi come crisi convulsive, deficit cognitivi (in particolare sulla memoria) e alterazioni comportamentali (Berntsson et al., 2018).

Storicamente, i gliomi sono stati classificati in base alla posizione anatomica e al modello istopatologico. Il grado di malignità (che aumenta dal grado I al grado IV) è stato determinato dall'estensione dell'atipia cellulare e dell'attività mitotica. Nella classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2007, i tumori gliali sono stati disposti in gruppi in base alla loro morfologia e il termine "glioblastoma" veniva utilizzato per indicare gliomi altamente maligni caratterizzati da proliferazione microvascolare e aree di necrosi.

Nel 2021, l'OMS ha aggiornato la classificazione dei tumori del SNC, suddividendo i gliomi in base a criteri istologici, molecolari e genetici. I tipi principali di Gliomi sono:

- Glioblastoma multiforme > IDH-*wildtype*
- Astrocitoma > IDH-mutante
- Oligodendroglioma > IDH-mutante associato alla codelezione cromosomica 1p/19q, un marcatore molecolare distintivo di questa neoplasia (Gisina et al., 2022).

Tra i gliomi, il glioblastoma multiforme (GBM), classificato come tumore di grado IV, è caratterizzato da un'elevata capacità invasiva, proliferativa e notevole eterogeneità molecolare. Queste caratteristiche contribuiscono alla difficoltà nel trattamento e all'elevato tasso di recidiva.

1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

Il glioblastoma multiforme (GBM) rappresenta la forma più aggressiva e frequente di gliomi primari negli adulti. Esso costituisce circa il 50-60% dei gliomi diffusi negli adulti e si manifesta più comunemente nei soggetti di età compresa tra 55 e 75 anni, con il picco di incidenza nel sesto decennio di vita (Louis et al., 2021; Ostrom et al., 2021).

La malattia mostra anche differenze di genere, in quanto gli uomini sono colpiti circa il 50% in più delle donne. Ciò può essere correlato ad alterazioni ormonali, differenze nell'espressione dei geni legati all'X e fattori ambientali. Nei bambini, il glioblastoma multiforme è raro e ha un profilo genetico diverso, suggerendo un meccanismo di patogenesi diverso (Królikowska et al., 2025).

Storicamente, i glioblastomi si distinguevano in due categorie principali: glioblastomi primari, che si sviluppano rapidamente *de novo* nella maggior parte negli adulti, e glioblastomi secondari che derivano da astrocitomi diffusi di basso grado e sono più frequenti nei giovani (Ohgaki & Kleihues, 2013). Questa classificazione è stata successivamente integrata grazie ai progressi nella biologia molecolare.

Secondo la classificazione CNS5 dell'OMS, il termine "glioblastoma" si applica esclusivamente ai gliomi diffusi dell'adulto caratterizzati da stato IDH-*wildtype* e da specifiche alterazioni molecolari, mentre i tumori con mutazione IDH sono classificati come astrocitomi IDH-mutanti di alto grado (Louis et al., 2021).

Una delle caratteristiche biologiche principali del glioblastoma è la sua eterogeneità genetica e molecolare, che contribuisce alla complessità della patologia e alla resistenza dei trattamenti. Sono state identificate numerose alterazioni genetiche nella patogenesi del tumore, tra cui mutazioni in geni come EGFR, PTEN, TP53, TERT e CDKN2A/B. In particolare, lo stato IDH-*wildtype* (isocitrato deidrogenasi di tipo selvaggio) è uno dei marcatori di identificazione più importanti che distingue il GBM da altri gliomi più favorevoli con mutazioni IDH (Królikowska et al., 2025; Politis et al., 2025). Lo sviluppo del glioblastoma è il risultato dell'accumulo continuo di alterazioni genetiche che interessano le cellule gliali, in particolare gli astrociti. Queste mutazioni trasformano le cellule normali in cellule tumorali caratterizzate da elevata capacità proliferativa e invasiva (Figura 1).

Un ruolo importante nella progressione del glioblastoma oltre alle alterazioni genetiche, è dato da modificazioni epigenetiche, tra cui la metilazione aberrante del DNA, le modifiche dell'istone e alterazioni nell'espressione dell'RNA non codificante (ncRNA). Questi meccanismi controllano l'oncogenesi e la resistenza ai trattamenti terapeutici (Meleiro & Henrique, 2025).

Nonostante i progressi terapeutici degli ultimi decenni, la sopravvivenza media dei pazienti con GBM è inferiore a un anno. Il trattamento standard con resezione chirurgica seguito da radioterapia e chemioterapia con temozolomide (TMZ) consente di raggiungere una sopravvivenza mediana di circa

14,6 mesi (Stupp et al., 2005). Tuttavia, il glioblastoma va sempre incontro a recidiva, principalmente a causa della sua capacità infiltrativa nel tessuto cerebrale circostante. Le cellule tumorali invasive si diffondono oltre i margini della massa tumorale, rendendo impossibile una completa eradicazione mediante chirurgia e contribuendo alla resistenza dei trattamenti terapeutici disponibili ad oggi (Hanif et al., 2017; Louis et al., 2021).

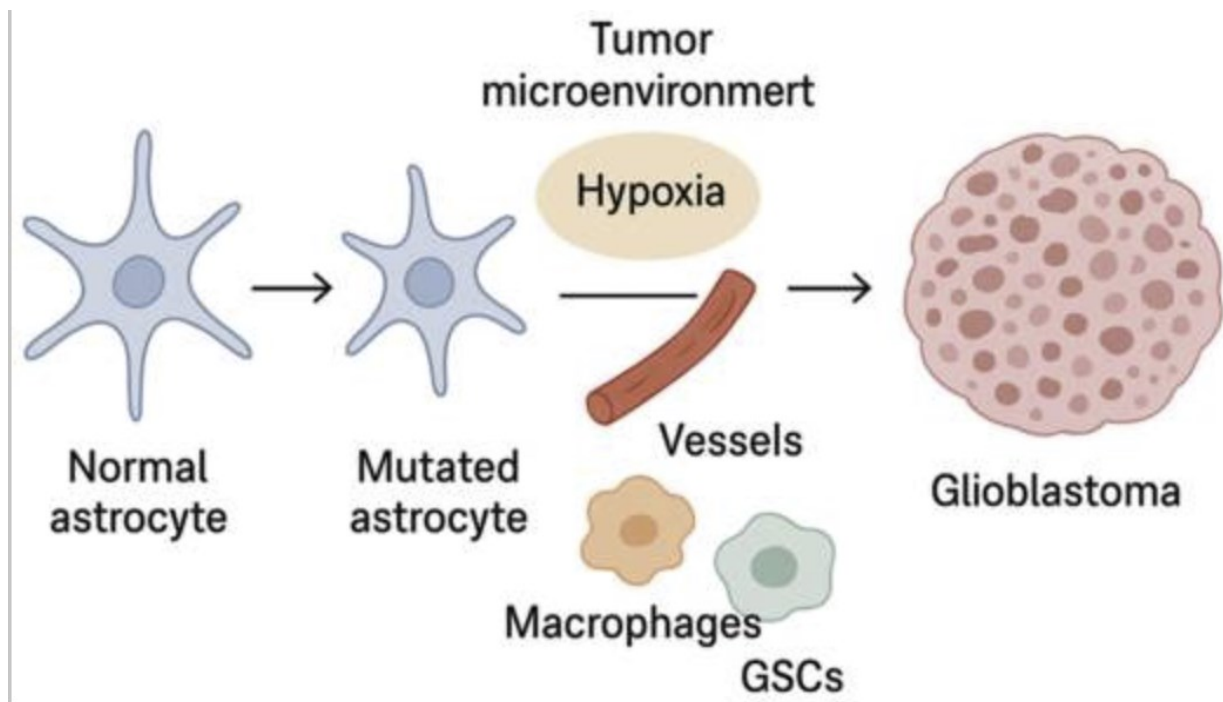


Figura 1. Trasformazione da astrociti normali a cellule mutate e influenza del microambiente tumorale (ipossia, vasi sanguigni, macrofagi e cellule staminali del glioma (GSC)) nell'insorgenza del GBM (Królikowska et al., 2025).

1.3 MARCATORI MOLECOLARI DEL GLIOBASTOMA

Nel corso degli anni, i progressi nella genomica e nella proteomica hanno portato alla scoperta di numerosi biomarcatori molecolari, ottenuti attraverso biopsia o campioni di fluido, i quali sono poi analizzati utilizzando la reazione a catena della polimerasi (PCR) e strumenti computerizzati. Essi rivestono un ruolo importante nella diagnosi, nella prognosi e nella definizione delle strategie terapeutiche (Shah et al., 2024).

1.3.1 MGMT

Il gene MGMT (O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasi) codifica per una proteina di riparazione del DNA. Il gene MGMT è localizzato sul cromosoma 10q26; nella maggior parte dei glioblastomi (GBM), uno degli alleli di questo cromosoma è frequentemente perso, lasciando la copia rimanente a sostenere la funzione genica (Shah et al., 2024). In condizioni normali, l'enzima MGMT interviene in caso di danno al DNA (alchilazione) mediante un processo definito "riparazione suicida". Questo processo consente a MGMT di rimuovere i gruppi alchilici nella posizione O⁶ della guanina, trasferendo il gruppo metilico a un residuo di cisteina dell'enzima, determinandone l'inattivazione (Fang, 2024).

L'espressione di MGMT è regolata da meccanismi epigenetici, in particolare dalla metilazione del promotore: quando il promotore MGMT è metilato, la sua espressione genica viene ridotta e di conseguenza le cellule tumorali hanno una capacità minore di riparare i danni al DNA causati da agenti alchilanti, risultando sensibili al trattamento da parte di agenti chemioterapici come la temozolomide (TMZ) (Della Monica et al., 2022).

1.3.2 EGFR

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), noto anche come HER1 o ERBB1, è un recettore a tirosin chinasi transmembrana (RTK), coinvolto nella regolazione di processi cellulari quali la proliferazione, la sopravvivenza e migrazione cellulare.

Nel glioblastoma, EGFR è comunemente soggetto a mutazioni, riarrangiamenti, splicing e amplificazione, svolgendo un ruolo chiave nella divisione cellulare, nella migrazione e nell'apoptosi (Shah et al., 2024).

Tra le alterazioni più rilevanti dell'EGFR nel glioblastoma vi è la variante mutata EGFRvIII, presente in circa il 30% dei casi e spesso associata all'amplificazione del gene EGFR. Questa mutazione è caratterizzata dalla delezione degli esoni 2–7, che comporta la perdita di una porzione del dominio extracellulare del recettore, rendendolo attivo anche in assenza di ligando. Questa attivazione costitutiva di EGFR è associata a una prognosi sfavorevole nei pazienti con glioblastoma (Johnson et al., 2012).

EGFR rappresenta quindi un potenziale bersaglio terapeutico: diversi studi stanno valutando l'efficacia di terapie mirate, come gli inibitori di EGFR e le terapie CAR-T specifiche. Tuttavia, i risultati ottenuti fino ad ora sono stati limitati, a causa dell'elevata eterogeneità del tumore e dello sviluppo di meccanismi di resistenza (Shah et al., 2024).

1.3.3 IDH 1/2

Le isocitrato deidrogenasi IDH1 e IDH2 sono enzimi coinvolti nel metabolismo cellulare e facilitano la conversione dell'isocitrato in alfa-chetoglutarato riducendo il NADP in NADPH, con contemporanea produzione di NADPH, molecola fondamentale per la rigenerazione del glutathione ridotto, l'antiossidante primario delle cellule (Shah et al., 2024).

IDH1 è localizzato nei perossisomi e nel citosol, mentre IDH2 si localizza nei mitocondri. Un terzo complesso enzimatico, IDH3, è codificato da tre geni distinti (*IDH3A*, *IDH3B* e *IDH3G*), nessuno dei quali è stato identificato come geni mutati in modo significativo nei tumori umani (Waitkus et al., 2018). Nel glioblastoma, le mutazioni interessano principalmente il gene IDH1, in particolare la sostituzione del singolo amminoacido R132H, che provoca la perdita della normale funzione enzimatica e sono per lo più eterozigoti (Shah et al., 2024; Verhaak et al., 2010).

1.3.4 TERT

Le mutazioni del promotore della trascrittasi inversa della telomerasi (TERT) sono fondamentali per la trasformazione maligna nelle GBM, e sono presenti in circa il 70% dei pazienti di GBM. Esse sono anche riconosciute come importanti marcatori diagnostici nella classificazione OMS del 2021 dei tumori del sistema nervoso centrale (Louis et al., 2021; Shah et al., 2024).

Il gene di TERT è situato sul cromosoma 5p15.33, e codifica la subunità catalitica della telomerasi, un enzima fondamentale per il mantenimento della lunghezza dei telomeri. Le mutazioni del promotore TERT più frequenti sono C228T e C250T, e causano un aumento dell'attività della telomerasi, consentendo alle cellule tumorali di mantenere i loro telomeri e continuare a dividersi, contribuendo alla crescita del tumore e all'aggressività (Powter et al., 2021; Shah et al., 2024). In presenza di altre alterazioni molecolari, come la metilazione di MGMT o con IDH *wild-type*, il decorso della malattia può essere più sfavorevole, mentre la coesistenza con mutazioni IDH può portare a prognosi più favorevoli.

In conclusione, valutare le mutazioni di TERT è fondamentale non solo per una prognosi più accurata, ma anche per orientare le strategie terapeutiche. (Shah et al., 2024).

1.3.5 TP53

Il TP53, localizzato sul cromosoma 17q13.1, codifica per la proteina p53, un oncosoppressore, coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Le mutazioni di TP53 sono frequenti

nei glioblastomi secondari, e sono spesso associate a mutazioni di IDH1/2 associate ad un andamento clinico più favorevole. Invece, nei glioblastomi primari, con maggiore grado di aggressività caratterizzati da stato IDH *wild-type*, la mutazione di TP53 è associata a una ridotta sopravvivenza. Le mutazioni di TP53 prese singolarmente non sono sufficienti per avere una prognosi accurata, ma diventano significative quando vengono associate ad altre alterazioni molecolari. Al fine di comprendere meglio l'evoluzione della malattia e le strategie terapeutiche da adottare, TP53 deve essere valutato all'interno del profilo molecolare complessivo del tumore (Shah et al., 2024).

1.3.6 VEGF

Il fattore di crescita endoteliale (VEGF), in particolare la forma VEGF-A, svolge un ruolo fondamentale nei processi di angiogenesi. Quando VEGF è sovra espresso, soprattutto nel GBM, favorisce la formazione di nuovi vasi sanguigni, che aiutano al tumore a crescere più velocemente, contribuendo a una prognosi sfavorevole. Sebbene VEGF sia il principale fattore angiogenico, i tumori GBM esprimono anche altri fattori pro-angiogenici, tra cui il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), le integrine, il fattore di crescita degli epatociti/fattore di spaccater, le angiopoietine, le efrine e l'interleuchina-8 (Shah et al., 2024).

La sovraespressione di VEGF nei glioblastomi ha portato allo sviluppo di un farmaco anti-angiogenico, Bevacizumab (BEV), per inibire la vascolarizzazione del tumore. BEV è un anticorpo monoclonale umanizzato che inibisce il VEGF-A, utilizzato soprattutto per ridurre l'edema peritumorale e migliorare in modo temporaneo i sintomi neurologici (Fu et al., 2023). Tuttavia, questo trattamento non ha portato a un reale aumento della sopravvivenza globale a causa della capacità del tumore di adattarsi e utilizzare nuovi meccanismi di sopravvivenza. Per questo motivo, sono ancora in corso studi per valutare approcci terapeutici contro l'angiogenesi tumorale (Shah et al., 2024).

1.3.7 ATRX

Il gene ATRX, che si trova sul cromosoma Xq21.1, codifica una proteina coinvolta nella regolazione della cromatina. Le mutazioni di ATRX sono associate al glioblastoma IDH-mutante, mentre sono rare nel glioblastoma IDH-*wild-type*. Pertanto, la sua valutazione è maggiormente utile per la classificazione molecolare dei gliomi (Shah et al., 2024).

1.4 SOTTOTIPI DI GBM

Il progetto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ha permesso di identificare diversi sottotipi molecolari di GBM sulla base dei profili di espressione genica.

In particolare, sono stati identificati tre sottotipi molecolari: proneurale, classico e mesenchimale, ognuno caratterizzato da specifiche alterazioni genetiche e da diversi comportamenti biologici (Verhaak et al., 2010).

Il sottotipo proneurale è associato ad alterazioni nei geni PDGFRA, IDH1 e TP53, e presenta un profilo di espressione genica simile a quello delle cellule neurali. Rispetto ad altri sottotipi di glioblastoma è correlato a una prognosi leggermente più favorevole dal punto di vista clinico (Verhaak et al., 2010).

Il sottotipo classico è invece caratterizzato principalmente dall'amplificazione del gene EGFR, tipicamente in assenza di mutazioni nel gene TP53 (Verhaak et al., 2010).

Il GBM mesenchimale è invece il sottotipo maggiormente aggressivo e invasivo. Esso è associato a mutazioni nei geni oncosoppressori, come NF1, PTEN e TP53 e all'attivazione di programmi trascrizionali legati ai processi infiammatori, al rimodellamento della matrice extracellulare e alla migrazione cellulare (Hanif et al., 2017).

È stato osservato che trattamenti terapeutici come radioterapia e chemioterapia possono indurre una transizione dallo stato proneurale a quello mesenchimale, fenomeno noto come “Transizione Proneurale-Mesenchimale” (PMT), processo che porta ad un aumento dell'aggressività tumorale (Xu et al., 2024).

Nella classificazione inizialmente fu incluso un quarto sottotipo, chiamato neuronale (NE). (Verhaak et al., 2010). Tuttavia, studi successivi basati sulle analisi del trascrittoma hanno dimostrato come il sottotipo NE era una porzione di tessuto cerebrale normale prelevato da pazienti affetti da glioblastoma, ed è quindi stato escluso dalla classificazione (Wang et al., 2017).

Nuovi studi hanno approfondito come l'eterogeneità tumorale non sia limitata alla presenza di diversi sottotipi nei pazienti, ma che possa essere osservata anche all'interno dello stesso tumore. Analisi di *single-cell RNA sequencing* hanno infatti dimostrato che le cellule tumorali possono esistere in diversi stati trascrizionali all'interno dello stesso tumore, contribuendo alla plasticità fenotipica del tumore.

Sono stati identificati quattro principali stati cellulari nel glioblastoma: cellule simili a progenitori neurali (*NPC-like*), cellule simili ai progenitori degli oligodendrociti (*OPC-like*), cellule simili agli astrociti (*AC-like*) e cellule con caratteristiche mesenchimali (*MES-like*) (Nefitel et al., 2019).

Studi recenti evidenziano come i sottotipi molecolari del glioblastoma siano influenzati dalla presenza di diverse sottopopolazioni cellulari, in particolare cellule staminali tumorali, che contribuiscono all'eterogeneità e alla plasticità del tumore (Steponaitis & Tamasauskas, 2021).

1.5 CELLULE STAMINALI DEL GLIOBLASTOMA (GSCs)

Le cellule staminali del glioblastoma (GSCs) rappresentano una sottopopolazione di cellule tumorali caratterizzate da capacità di auto-rinnovamento e differenziamento, e svolgono un ruolo fondamentale nella crescita e nel mantenimento del tumore (Lathia et al., 2015; Seymour et al., 2015; Singh et al., 2004).

Le GSCs sono suddivise in diversi sottogruppi, principalmente proneurale (PN) e mesenchimale (MES), che riflettono i sottotipi molecolari del glioblastoma (paragrafo 1.4).

Le GSCs mostrano un'elevata plasticità fenotipica, e sono in grado di passare da uno stato proneurale a uno stato mesenchimale, secondo un processo mediato da segnali infiammatori e dall'attivazione della via NF-KB (Bhat et al., 2013).

Inoltre, è stato dimostrato che fattori del microambiente, come l'ipossia, e trattamenti come chemioterapia e radioterapia possono favorire l'espansione della popolazione di GSCs, inducendo anche cellule tumorali più differenziate ad acquisire caratteristiche staminali, contribuendo infine alla progressione del tumore e alla recidiva della malattia (Garnier et al., 2019).

Le GSCs con fenotipo mesenchimale sono quelle più aggressive, mostrano un'aumentata attività glicolitica e un'elevata espressione dell'enzima ALDH1A3, caratterizzate da maggiore invasività, attività pro-angiogenica e resistenza ai trattamenti (Bhat et al., 2013; Mao et al., 2013).

Diversi studi hanno dimostrato che le GSCs mostrano maggiore resistenza alla TMZ grazie all'attivazione di meccanismi di riparazione del DNA, tra cui la non metilazione del promotore MGMT, che determina quindi l'espressione della proteina O⁶-metilguanina-DNA-metiltrasferasi, associata a una riduzione del danno genotossico indotto dal farmaco (Beier et al., 2011).

1.5.1 TRATTAMENTI TERAPEUTICI DEL GBM

Il trattamento standard del GBM si basa sulla chirurgia, seguita da radioterapia e chemioterapia con temozolomide, approccio che ha determinato un miglioramento della sopravvivenza dei pazienti. Nonostante i progressi terapeutici ottenuti negli anni, il glioblastoma continua ad essere uno dei tumori cerebrali più aggressivi con elevata mortalità.

Nel corso degli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi approcci, come terapie mirate con farmaci anti-angiogenici, come bevacizumab, utilizzato per il trattamento del GBM ricorrente. Nel 2015, la FDA ha approvato l'uso di Optune, un dispositivo medico basato sulla produzione di campi elettrici alternati a bassa intensità, in grado di interferire con la proliferazione delle cellule tumorali. Nonostante questa nuova terapia, una elevata percentuale di pazienti continua a riscontrare una recidiva del tumore entro 1 o 2 anni dalla prima diagnosi (Angom et al., 2023; Le Rhun et al., 2019). Per questo motivo, negli ultimi anni sono state sviluppate nuove strategie terapeutiche, in particolare immunoterapie come i vaccini, inibitori dei checkpoint immunitari e cellule CAR-T. Tuttavia, anche queste terapie mostrano un'efficacia limitata.

1.5.2 LIMITAZIONI TERAPEUTICHE DEL GBM

Nonostante i progressi nella ricerca, il GBM mostra un alto tasso di resistenza alle terapie.

Le cause principali che hanno portato al fallimento terapeutico sono legate alla complessità biologica del tumore. In particolare, l'elevata eterogeneità tumorale, poiché all'interno dello stesso tumore coesistono popolazioni cellulari con caratteristiche differenti che rispondono in modo diverso ai trattamenti.

Tra i fattori che maggiormente determinano la resistenza del tumore alle terapie sono presenti le GSCs grazie alla loro capacità di autorinnovamento, l'attivazione dei meccanismi di riparazione del DNA, come l'attività di MGMT che riduce l'efficacia dei chemioterapici, e la limitata penetrazione dei farmaci dovuta dalla barriera-ematoencefalica (Angom et al., 2023).

Inoltre, il microambiente tumorale svolge un ruolo chiave: esso è caratterizzato da molti fattori che contribuiscono alla resistenza delle terapie e all'immunosoppressione (Figura 2). Ad esempio, l'ipossia favorisce il mantenimento delle GSC, promuove fenotipi più aggressivi e rende il glioblastoma più resistente ai trattamenti; l'angiogenesi aberrante che porta alla formazione di vasi sanguigni difettosi e disorganizzati; inoltre, i tumori GBM sono noti per creare un microambiente immunosoppressivo, in cui le cellule T, le cellule soppressori mieloidi e macrofagi associati al tumore inibiscono la risposta immunitaria antitumorale (Feldman, 2024).

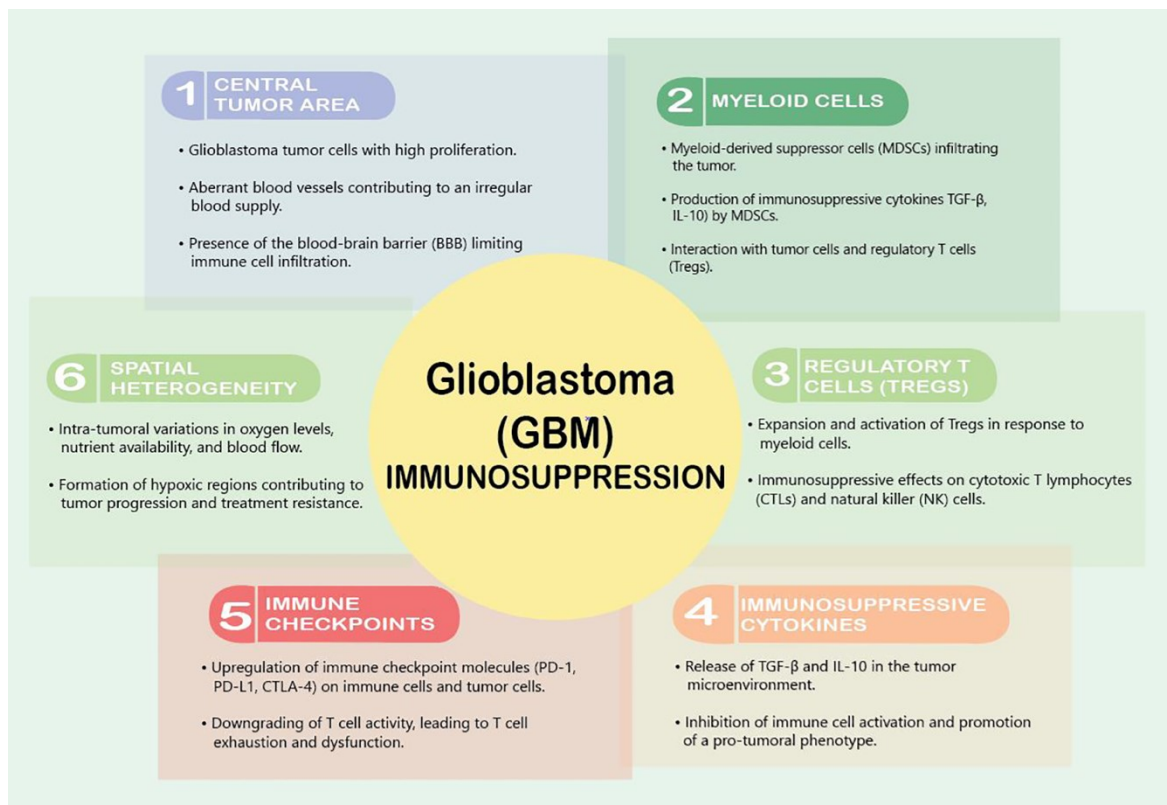


Figura 2. Fattori che contribuiscono all'immunosoppressione nel GBM. (Feldman, 2024)

1.6 LINEE CELLULARI DI GBM

Le linee cellulari sono il modello *in vitro* utilizzato per lo studio dello sviluppo e della progressione del GBM. Grazie alla loro capacità di proliferare indefinitamente in coltura, il loro utilizzo consente di analizzare i meccanismi molecolari della tumorigenesi e di valutare nuovi approcci terapeutici. Esistono due principali categorie di linee cellulari: le linee immortalizzate e le cellule primarie.

1.6.1 CELLULE IMMORTALIZZATE

Le linee cellulari immortalizzate derivano da tumori umani e sono in grado di crescere in coltura e differenziarsi all'infinito. Questa proprietà è dovuta dall'acquisizione di alterazioni genetiche che permettono alle cellule di superare i normali meccanismi di senescenza cellulare e di apoptosi, ad esempio l'attivazione delle telomerasi e l'alterazione di *pathway* coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, i quali consentono il mantenimento della capacità proliferativa nel tempo (Hanahan & Weinberg, 2011). Queste cellule in coltura richiedono una minore quantità di fattori di crescita e fattori sierici rispetto alle colture cellulari classiche.

La linea cellulare immortalizzata maggiormente utilizzata nello studio del GBM è la U251, che rappresenta anche uno dei modelli più diffusi nella ricerca preclinica (Pontén & Westermarck, 1978; Torsvik et al., 2014). Inoltre, studi recenti hanno evidenziato come, nelle cellule U251, l'attività di specifici canali ionici è associata a processi di proliferazione, migrazione e invasività tumorale (Ratto et al., 2020). L'utilizzo di linee cellulari immortalizzate è vantaggioso per quanto riguarda la facilità di coltura, il basso costo e la possibilità di manipolazione genetica, ma uno dei principali limiti è rappresentato dalla perdita progressiva delle caratteristiche genetiche e fenotipiche del tumore che aumenta ad ogni passaggio in coltura

1.6.2 CELLULE PRIMARIE

Le cellule primarie sono isolate direttamente dal tumore di un paziente mediante biopsia, prelievo chirurgico o *post-mortem*, e successivamente sono mantenute *in vitro* mediante l'utilizzo di terreni di coltura specifici. In questo modo, le cellule primarie mantengono le caratteristiche fenotipiche e molecolari del tumore originario.

Per mantenere le proprietà staminali e la loro capacità proliferativa, il terreno di coltura delle cellule primarie viene arricchito con fattori di crescita come *EGF* e *bFGF* (Abbott, 2003; Lee et al., 2006). Le cellule primarie hanno una limitata capacità proliferativa: dopo un definito numero di divisioni cellulari entrano in senescenza replicativa, fenomeno noto come “limite di Hayflick”, per cui possono essere utilizzate per un periodo di tempo limitato dopo il loro isolamento.

1.7 VASCULARIZZAZIONE TUMORALE E *VASCULOGENIC MIMICRY*

1.7.1 VASCULARIZZAZIONE TUMORALE E ANGIOGENESI

La crescita e la progressione dei tumori solidi dipendono dalla capacità di sviluppare una rete vascolare funzionale, fondamentale per fornire ossigeno e nutrienti alle cellule tumorali. Storicamente, questo processo è stato attribuito all'angiogenesi, cioè la formazione dei vasi sanguigni a partire da quelli già esistenti, secondo i modelli descritti da Folkman (Ausprunk & Folkman, 1977). Il modello classico di angiogenesi tumorale si basa sul *germogliamento endoteliale*, un processo in più fasi in cui segnali pro-angiogenici inducono la degradazione della membrana basale e la migrazione delle cellule endoteliali (EC) verso il tessuto connettivo circostante. La formazione dei nuovi vasi sanguigni avviene attraverso la proliferazione e l'organizzazione delle EC in combinazione con la formazione di una nuova membrana basale e il reclutamento delle cellule pericitiche o murali.

Nei primi anni '90 è stato descritto un nuovo modello di germogliamento endoteliale, suddiviso in tre fasi: alterazione strutturale della membrana basale, seguita dalla migrazione continua delle cellule endoteliali che mantengono la loro polarità basale-luminale, e infine il reclutamento dei periciti lungo la nuova membrana basale, contribuendo alla formazione del vaso neoformato (De Palma et al., 2017; Delgado-Bellido et al., 2023a).

1.7.2 MECCANISMI ALTERNATIVI DI VASCOLARIZZAZIONE TUMORALE

Numerosi studi hanno dimostrato che i tumori, soprattutto quelli molto aggressivi come il glioblastoma (GBM), sono in grado di sfruttare meccanismi alternativi di vascolarizzazione, tra cui:

- la cooptazione vascolare, il tumore sfrutta vasi già esistenti nel tessuto ospite (Holash et al., 1999).
- l'intussuscezione vascolare, i vasi si formano per invaginazione interna, attraverso la formazione di pilastri intraluminari (Djonov et al., 2000).
- la *vasculogenic mimicry* (VM), le cellule tumorali formano strutture simil-vascolari (Delgado-Bellido et al., 2023a).

1.7.3 VASCUOLOGENIC MIMICRY

La *vasculogenic mimicry* (VM) è la capacità delle cellule tumorali di organizzarsi in strutture simil-vascolari funzionali, in assenza di cellule endoteliali. Le cellule tumorali stesse e la matrice extracellulare costituiscono dei canali che consentono il trasporto di fluidi contribuendo alla perfusione del tumore. Questo fenomeno fu osservato per la prima volta da (Maniotis et al., 1999) nel melanoma uveale; da allora, la VM è stata osservata in diversi tipi di tumori maligni come il cancro al seno, il cancro al fegato, il cancro ovarico, alla prostata e sarcomi (Cao et al., 2013; Delgado-Bellido et al., 2023a). Molti studi hanno evidenziato che la presenza di strutture di VM è strettamente associata ad una maggiore aggressività tumorale, ad un aumento di metastasi e ad una prognosi sfavorevole (Cao et al., 2013).

Nei tumori cerebrali, la VM è stata osservata principalmente nei gliomi ad alto grado, incluso il glioblastoma multiforme GBM (Liu et al., 2011; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2007).

Queste strutture risultano inoltre ricche di componenti della matrice extracellulare, tra cui laminina, collagene IV e proteoglicani, contribuendo alla formazione di una rete tridimensionale organizzata (Cao et al., 2013).

1.7.4 MARCATORI MOLECOLARI DELLA VM

Dal punto di vista molecolare, la VM è associata all'espressione di marcatori tipici delle cellule endoteliali, nonostante l'origine tumorale delle cellule coinvolte. Tra i principali marcatori si includono la *VE-caderina*, il CD31 e il recettore tirosin-chinasico (TIE-1) (Delgado-Bellido et al., 2023a). Inoltre, tra i regolatori molecolari, un ruolo chiave è svolto dal recettore EphA2 (recettore 2 dell'efrina di tipo A), la cui espressione è regolata dalla *VE-caderina*, anche se il meccanismo è poco chiara, ed è frequentemente associata a tumori altamente aggressivi (Hess, 2001; J. Park et al., 2013). I meccanismi che si trovano alla base della VM derivano da interazioni tra segnali intracellulari e componenti della matrice extracellulare. Anche se le cellule tumorali coinvolte nella VM hanno in comune alcuni marcatori con le cellule endoteliali, questi processi risultano diversi dall'angiogenesi classica, presentando delle caratteristiche molecolari e funzionali che li distingue dalle cellule endoteliali (Figura 3).

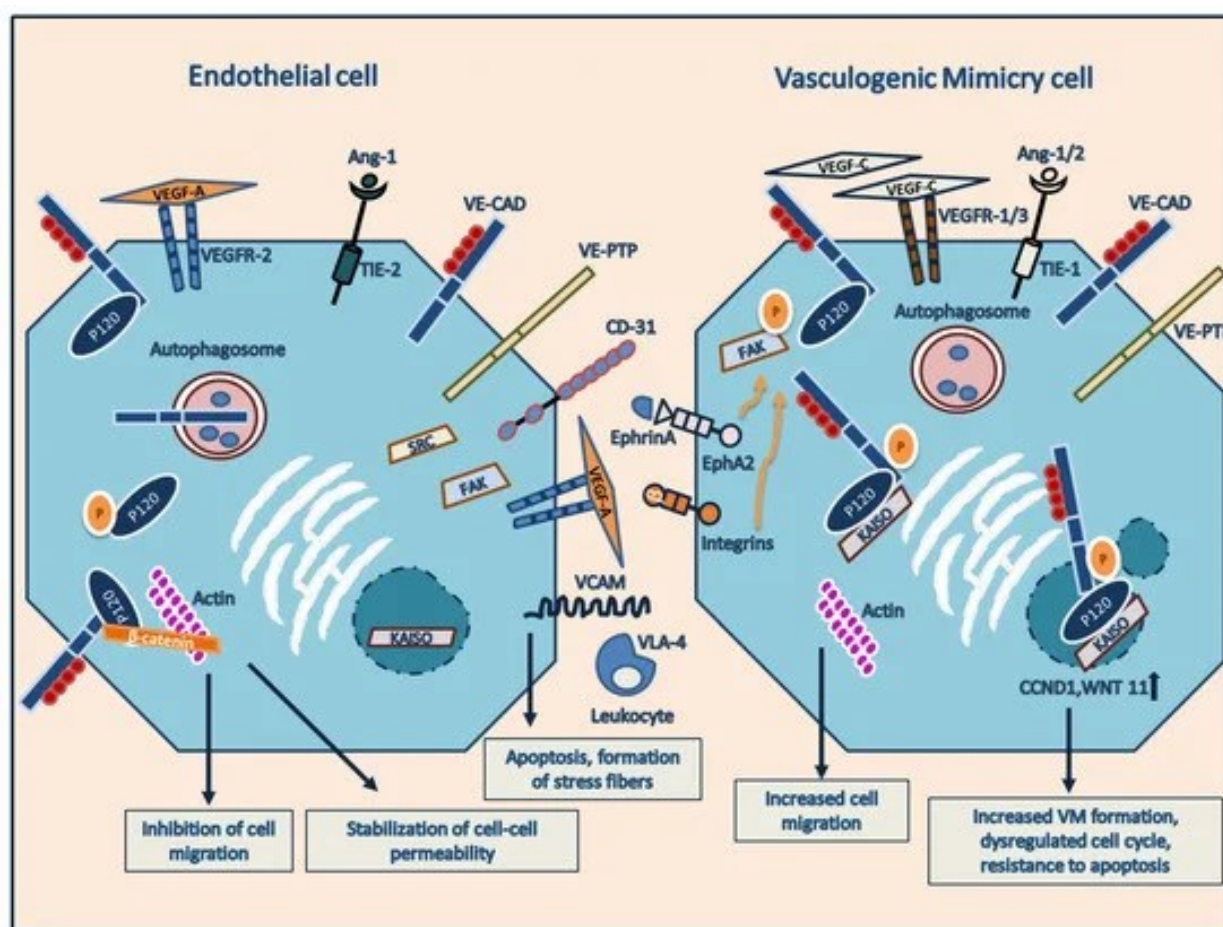


Figura 3. Rappresentazione schematica della VM e confronto tra cellule endoteliali e cellule tumorali (Delgado-Bellido et al., 2023b).

1.7.5 MICROAMBIENTE TUMORALE E VM

Un ruolo fondamentale nella regolazione della VM è svolto dal microambiente tumorale, in particolare dalla condizione di ipossia (bassa concentrazione di ossigeno). L'ipossia è strettamente associata alla malignità, alle metastasi e alla resistenza terapeutica. La ridotta concentrazione di ossigeno può innescare la trasformazione delle cellule, che acquisiscono maggiore plasticità fenotipica, favorendo la loro migrazione attraverso il processo di transizione epiteliale-endoteliale (EET). Questo fenomeno è caratterizzato dalla *downregulation* delle molecole di adesione cellulare, come la *E-caderina* e dall'*up-regulation* delle proteine associate all'angiogenesi, come la *VE-caderina* e la fibronectina, favorendo la formazione di strutture simil-vascolari (Nobre et al., 2018; Sun et al., 2007).

Le cellule staminali tumorali possono inoltre contribuire alla formazione della rete di VM per rimodellare la matrice extracellulare (ECM) (Wei et al., 2021).

1.8 MIGRAZIONE CELLULARE NEL GLIOBASTOMA

La migrazione cellulare è un processo fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi tissutale, per la risposta immunitaria e la riparazione dei tessuti. Nei contesti patologici, in particolare nelle neoplasie, questo processo può risultare aberrante e contribuire alla progressione e diffusione tumorale (Trepate et al., 2012). La migrazione cellulare è regolata da una riorganizzazione del citoscheletro, e da segnali intracellulari che modulano l'interazione con la matrice extracellulare (ECM). Questo processo include diverse fasi coordinate: la formazione di protrusioni di membrana, come lamellipodi e filopodi, l'instaurazione di adesioni con il substrato, la generazione di forze contrattili tramite il sistema actinomioisino e il distacco delle adesioni nella porzione posteriore della cellula. Le cellule possono adottare diversi meccanismi di migrazione, come la migrazione mesenchimale e ameboide. Le cellule tumorali sfruttano soprattutto la migrazione mesenchimale, associata a cellule con morfologia allungata, forte adesione all'ECM e formazioni di protrusioni (Alexander et al., 2008). La migrazione ameboide invece, è utilizzata prevalentemente da cellule immunitarie e da cellule germinali primordiali, caratterizzate da una morfologia arrotondata, con adesioni deboli e maggiore velocità di movimento (Sadjadi et al., 2022).

Le cellule possono migrare sia come cellule singole sia in maniera collettiva. La migrazione collettiva implica la collaborazione tra cellule “*leader*”, situate nella parte anteriore e responsabili della formazione delle protrusioni del rimodellamento della matrice, possono anche secernere metalloproteasi che degradano l'ECM facilitando l'invasione del tessuto circostante, e cellule

“*follower*”, che contribuiscono al movimento coordinato del gruppo (Mayor & Etienne-Manneville, 2016).

Nel glioblastoma multiforme, la migrazione cellulare rappresenta una delle caratteristiche principali dell'elevata aggressività del tumore, perché le cellule sono in grado di infiltrare il tessuto cerebrale sano circostante, rendono difficile la rimozione chirurgica.

La migrazione è inoltre regolata da specifiche interazioni molecolari tra cellule tumorali e ECM, recettori come le integrine, CD44 e componenti del sistema actinomiosinico che svolgono un ruolo chiave nel controllo dell'adesione e della motilità cellulare (Santoro et al., 2025).

Alcuni studi hanno evidenziato che fattori intracellulari, come il metabolismo del ferro, possono regolare la migrazione cellulare nel GBM. In particolare, elevati livelli di ferro possono inibire la migrazione cellulare attraverso la riduzione dell'espressione di CDC42, una GTPasi coinvolta nella polarizzazione cellulare (Shenoy et al., 2023).

Inoltre, è stato dimostrato che parametri fisico-chimici tra cui l'ipossia, tipica dei tumori solidi, promuovono cambiamenti fenotipici che aumentano la capacità migratoria e invasiva delle cellule (J.-A. Park et al., 2016).

1.9 RUOLO DEI CANALI IONICI NELLA MIGRAZIONE CELLULARE

I canali ionici sono proteine integrali di membrana che regolano il movimento degli ioni tra i compartimenti cellulari, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi e del potenziale di membrana. I canali ionici possono essere classificati in canali voltaggio-dipendenti (VGC) e ligando-dipendenti (LGC). Per i canali voltaggio-dipendenti l'attivazione è determinata dal flusso selettivo di ioni come Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- regolati dal potenziale di membrana. I canali ligando-dipendenti, invece, sono classificati in base alla natura della molecola di segnalazione (ligando) che li attiva (acetilcolina, GABA, glutammato) (Kunzelmann, 2005). Quando sono aperti, i canali ionici facilitano il passaggio selettivo di ioni lungo il gradiente elettrochimico, questo flusso ionico regola numerosi processi cellulari, come la proliferazione, apoptosi e necrosi cellulare (Jakab & Ritter, 2006; Sundelacruz et al., 2009).

Numerosi studi hanno evidenziato come l'espressione alterata di canali ionici sia associata alla trasformazione neoplastica e alla progressione tumorale. Questo ha portato alla definizione del concetto di “oncochannelopatia” e i canali coinvolti sono chiamati “*oncochannels*”(Prevarskaya et al., 2018).

1.9.1 CANALI IONICI NEL GBM

Nel GBM, i canali ionici svolgono un ruolo fondamentale nei processi di migrazione e invasione cellulare, contribuendo all'elevata aggressività del tumore. È stato dimostrato che circa il 90% dei campioni di GBM analizzati presentano delle mutazioni a carico dei canali ionici e dei trasportatori di membrana, portando squilibri elettrochimici ed alterate risposte fisiologiche (Molenaar, 2011).

La migrazione delle cellule di GBM richiede dei cambiamenti strutturali, regolati sia dalla riorganizzazione del citoscheletro sia dall'attività di alcuni canali ionici (Catacuzzeno et al., 2015a; Turner et al., 2014). I canali ionici, infatti, modulano il flusso di ioni e acqua, determinando variazione del volume della cellula, favorendo l'adattamento della cellula in movimento all'ambiente circostante. Questo fenomeno è noto come *cell shrinkage and elongation*, e consente alla cellula di assumere una forma allungata e invadere il parenchima cerebrale mediante variazioni del volume cellulare (Turner et al., 2014). Durante la migrazione cellulare, si verifica l'estensione del lamellipodio, associato all'aumento del volume cellulare, determinato dall'ingresso dell'acqua attraverso le acquaporine. Il flusso di acqua è regolato dalla formazione del gradiente osmotico creato dai canali ionici e trasportatori di membrana, tra cui il cotrasportatore NKCC (Na^+ - K^+ - Cl^-). L'accumulo intracellulare di K^+ e Ca^{2+} favorisce l'attivazione di canali del potassio calcio-dipendenti, come BK e IK, che porta alla fuoriuscita di K^+ e acqua con conseguente riduzione del volume cellulare (Catacuzzeno et al., 2015b).

Nuovi studi hanno evidenziato il coinvolgimento specifico di alcuni canali ionici nella progressione del GBM. Ad esempio, il ruolo centrale del canale Nav nella proliferazione di una linea cellulare PN del GBM e nella resistenza alla chemioterapia (Giammello et al., 2024), ed il coinvolgimento dei canali BK e Kir1.4 nelle cellule U251 nei processi migratori delle cellule di glioma (Brandalise et al., 2023; Ratto et al., 2020).

1.10 LO SCAMBIATORE $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) è una proteina di membrana osservata per la prima volta negli assoni dei calamari dal gruppo di ricerca guidato da Baker e successivamente nel tessuto cardiaco da Reuter e Seitz (Nicoll et al., 2013). NCX appartiene alla famiglia degli antiportatori Ca^{2+} /cationi ed è conservato tra diverse specie. Esso svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare del calcio e utilizza il gradiente elettrochimico del sodio per mediare il flusso bidirezionale di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica, operando come trasportatore attivo secondario (Boyman et al., 2013; Khananshvili, 2022).

Strutturalmente è costituito da dieci segmenti transmembrana e da un ampio anello citosolico lungo ~500 residui, contenente domini regolatori per il Ca^{2+} (CBD1 e CBD2), responsabili del controllo allosterico dell'attività del trasportatore (Figura 4) (Hilge, 2012).

Nei mammiferi sono state identificate tre isoforme principali dello scambiatore, codificati rispettivamente dai geni SLC8A1, SLC8A2 e SLC8A3, con distribuzione tessuto-specifica:

- NCX1, espresso soprattutto in neuroni, cellule gliali, cardiomiociti e tessuto renale (Scognamiglio et al., 2025);
- NCX2, espresso principalmente nel cervello, midollo spinale, nell'apparato gastrointestinale e nei reni (Morales et al., 2001);
- NCX3, presente sia nel muscolo scheletrico che nel sistema nervoso centrale (Sosnoski & Gay, 2008).

Dal punto di vista funzionale, NCX opera con una stechiometria di 3 Na^+ per 1 Ca^{2+} , generando un flusso elettrogenico che contribuisce alla regolazione del potenziale di membrana e delle concentrazioni di calcio intracellulare (Ottolia et al., 2021).

NCX opera in due modalità: *forward*, rappresenta il ruolo fisiologico principale, in cui favorisce l'espulsione di Ca^{2+} dalla cellula, e *reverse*, che costituisce il meccanismo patologico o specializzato in cui favorisce l'ingresso di Ca^{2+} in risposta all'aumento della concentrazione intracellulare di Na^+ o alla depolarizzazione della membrana (Blaustein & Lederer, 1999; Wu et al., 2011).

Nel GBM, in particolare, la regolazione del Ca^{2+} risulta alterata dalla progressione della malattia. Studi recenti hanno evidenziato un aumento dell'espressione dell'isoforma NCX1 nelle cellule GBM durante il processo di migrazione, suggerendo un ruolo diretto dello scambiatore nella modulazione dei segnali coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare (Brandalise et al., 2023). L'attività di NCX è stata associata alla motilità cellulare, in grado di facilitare la formazione dei lamellipodi, fondamentali per la migrazione cellulare (Brandalise et al., 2023; Song et al., 2014).

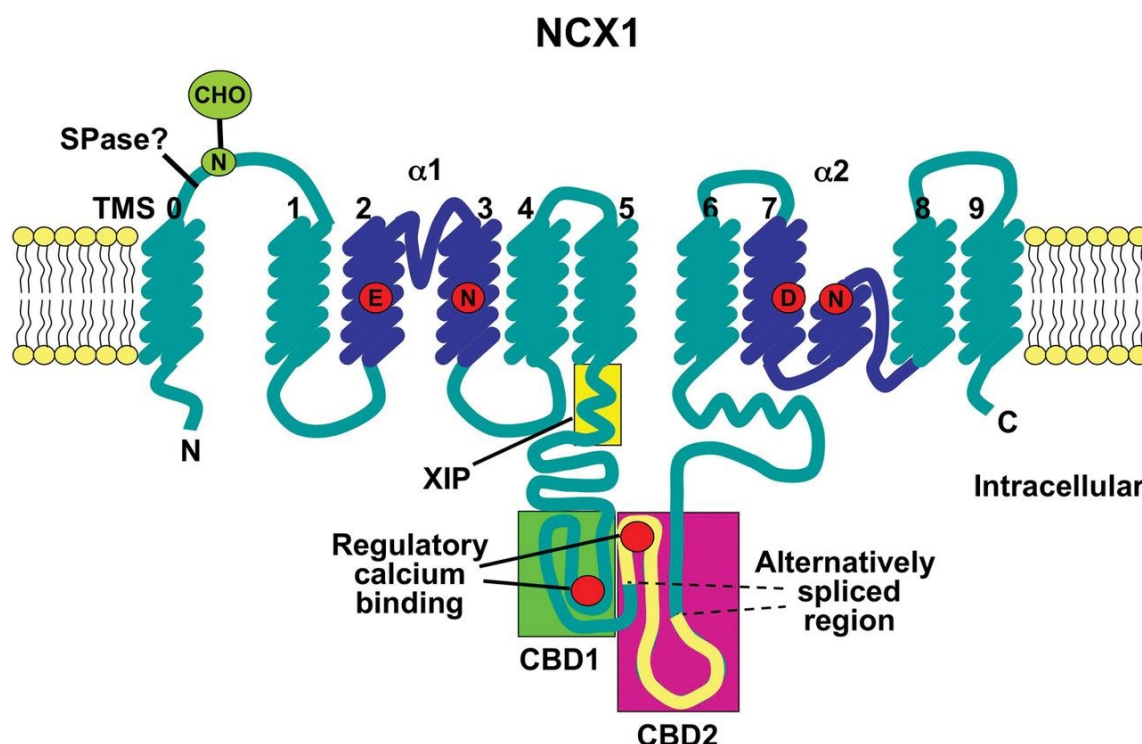


Figura 4. Rappresentazione schematica della struttura dello scambiatore NCX. Il modello propone dieci segmenti transmembrana (TM0 a TM9) organizzati in due domini con orientamento opposto. Le eliche TM2, TM3 e TM7 formano il sito di legame ionico, costituito da residui di aminoacidi evidenziati in rosso (Glu113, Asn143, Asp814 e Asn842). In verde è rappresentato il sito di glicosilazione (N-CHO). Nel dominio citosolico sono presenti due domini di regolazione del calcio, CBD1 e CBD2 (Lytton, 2007).

1.11 GLI SFEROIDI COME MODELLO TUMORALE TRIDIMENSIONALE *IN VITRO*

Gli sferoidi tumorali tridimensionali (3D) rappresentano uno dei modelli *in vitro* più utilizzato per lo studio dei tumori solidi, che rappresentano oltre il 90% dei decessi totali. A differenza delle culture bidimensionali, gli sferoidi sono aggregati di cellule che mimano in modo più realistico la struttura e la complessità del tessuto tumorale. Gli sferoidi tumorali 3D hanno una stretta somiglianza con l'organizzazione e la complessità fisiologica del tessuto, mantenendo le interazioni cellula-cellula o cellula-matrice, la disposizione concentrica delle popolazioni cellulari in regioni proliferanti eterogenee e i gradienti fisico-chimici che imitano lo stadio del tumore solido avascolare (Senrunga et al., 2023).

L'architettura cellulare degli sferoidi tumorali comprende tre zone: la zona necrotica forma il nucleo costituito da cellule morte o ipossiche, basso contenuto di ossigeno e scarso contenuto di nutrienti; la zona quiescente rappresenta la regione tra la zona necrotica e proliferativa, caratterizzata da cellule non proliferative, con un contenuto di ossigeno e nutrienti relativamente più alto; la zona proliferativa

o esterna è costituita da cellule che si dividono attivamente, simulando le cellule tumorali che si dividono attivamente nei vasi sanguigni vicini in condizioni tumorali *in vivo* (Senrunga et al., 2023).

Un'altra caratteristica degli sferoidi è la capacità intrinseca di produrre componenti della matrice extracellulare, come fibronectina, laminina, collagene e glicosaminoglicani, partecipando così alla formazione di un microambiente tumorale più realistico rispetto ad una coltura 2D.

Gli sferoidi possono essere costituiti da un singolo tipo cellulare oppure includere più popolazioni cellulari. In generale, gli sferoidi monocellulari risultano più semplici da generare e sono ampiamente utilizzati negli studi sperimentali, mentre quelli eteromulticellulari permettono di includere componenti stromali e vascolari, aumentando la rilevanza fisiopatologica del modello (Senrunga et al., 2023; Zhuang et al., 2024).

Degli studi sperimentali hanno dimostrato che cellule derivate da sferoidi di glioblastoma sono in grado di generare tumori infiltrativi *in vivo*, mantenendo caratteristiche biologiche e istologiche simili al tumore umano, a conferma che gli sferoidi rappresentano un modello preclinico avanzato (Zhou et al., 2017).

2. SCOPO

Il glioblastoma multiforme (GBM) rappresenta il tumore cerebrale più aggressivo e frequente nell'uomo, caratterizzato da elevata capacità proliferativa, invasività e marcata resistenza ai trattamenti terapeutici. La progressione tumorale è legata alla sua capacità di infiltrare il parenchima cerebrale circostante, rendendo difficile la completa eradicazione del tumore e aumentando il tasso di recidiva della malattia.

Questo lavoro si basa su precedenti risultati pubblicati presso il Laboratorio di Neurobiologia e Fisiologia Integrata dell'Università di Pavia, sotto la supervisione della Professoressa Paola Rossi, dove è stato evidenziato come l'attività dello scambiatore sodio-calcio (NCX) induce la migrazione cellulare in una linea cellulare immortalizzata di GBM, le U251 (Brandalise et al., 2023). La ricerca si inserisce inoltre nel contesto del Consorzio Immunohub (Traiettorie 4 del Piano Operativo Salute (POS), linea di Azione 4.1 "Creazione di Hub delle Scienze della Vita", Project IMMUNOHUB, T4-CN-02), finanziato dal Ministero della Salute, finalizzato all'identificazione di nuovi target terapeutici contro il glioblastoma chemioresistente.

La presente tesi si propone di indagare il ruolo dello scambiatore NCX1 nella migrazione e nel mimetismo vascolare in cellule primarie mesenchimali di GBM (GBM19), caratterizzate da elevata aggressività, invasività e plasticità fenotipica. Le cellule primarie rappresentano un modello tumorale capace di mantenere le caratteristiche molecolari e biologiche del tumore originario.

In questo lavoro è stato valutato l'effetto del bepridil, bloccante farmacologico di NCX1, sulla vitalità e capacità migratoria delle GBM19 mediante saggio MTT e *wound-healing assay*, e osservato il potenziale coinvolgimento nella comparsa spontanea di strutture di mimetismo vascolare. Inoltre, sono stati utilizzati sferoidi tridimensionali di GBM19 come modello tumorale *in vitro*, in grado di rappresentare l'architettura del tumore in maniera più realistica rispetto alle colture cellulari bidimensionali tradizionali, al fine di osservare il comportamento invasivo e l'organizzazione cellulare di GBM.

In riferimento a questi due aspetti, la migrazione cellulare e le dinamiche vasculogeniche, questo studio si propone di valutare di NCX1 come potenziale bersaglio terapeutico nel GBM.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURA CELLULARE DI GLIOBLASTOMA UMANO (GBM19)

Le cellule primarie di glioblastoma umano appartenenti alla linea GBM19 sono state gentilmente fornite dal laboratorio del Professore T. Florio dell'università di Genova. Questa linea cellulare deriva da una biopsia tumorale ottenuta da una paziente di 41 anni colpita da glioblastoma di grado IV di sottotipo mesenchimale. Il prelievo del tessuto tumorale è stato effettuato dopo il consenso del paziente e con l'approvazione del Comitato Etico Istituzionale (Giammello et al., 2024). Le cellule sono state coltivate in un terreno di crescita specifico per mantenere le proprietà delle cellule staminali tumorali e prevenire il differenziamento. La composizione del mezzo di coltura era la seguente:

- 48 % di *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ad alto contenuto di glucosio combinato in rapporto 1:1 con *Ham's F12* (EuroClone).
- 48% di *NeuroCult NS-A Basal Medium (human)* (Stemcell Technologies), utilizzato per supportare la sopravvivenza e il funzionamento delle cellule neurali.
- 1% di *IX B-27TM supplement* (Thermo Fisher Scientific), un additivo privo di siero che favorisce la crescita cellulare e contribuisce al mantenimento della vitalità delle cellule del sistema nervoso centrale sia a breve che a lungo termine.
- 0.2% di Penicillina/Streptomicina (Thermo Fisher Scientific), per prevenire eventuali contaminazioni batteriche.
- 0.4% *Epidermal growth factor* (EGF) e 0.4% *Fibroblast growth factor* (FGF) (Sigma Aldrich), fattori di crescita fondamentali per mantenere i processi di proliferazione, migrazione e mantenimento dello stato proliferativo delle cellule tumorali staminali in coltura.

Il volume del terreno di coltura utilizzato varia a seconda delle dimensioni e del tipo di contenitore di coltura: una capsula di Petri da 3.5 cm contiene 1.5-2 mL, una flask T25 contiene 4 mL, una flask T75 contiene 10 mL.

Tutte le procedure di manipolazione cellulare sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare, per ridurre il rischio di contaminazione. La cappa è caratterizzata da filtri HEPA tramite i quali il sistema garantisce un flusso verticale continuo di aria filtrata su tutto il piano di lavoro. Prima e dopo ogni utilizzo, la cappa viene disinfettata con etanolo al 70%. Inoltre, è stata utilizzata la luce ultravioletta (UV) per sterilizzare il piano di lavoro e le attrezzature.

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C, con il 98% di umidità relativa e il 5% di CO₂.

3.2 PASSAGGIO CELLULARE

Una volta raggiunta un'elevata densità, circa il 90% di confluenza, le cellule venivano trasferite in altre flask contenenti terreno di coltura fresco, in modo da garantire delle condizioni ottimali per la proliferazione delle cellule. La procedura prevedeva inizialmente la rimozione del mezzo di coltura tramite aspirazione, seguita da lavaggi con PBS 1X (EuroClone) per eliminare residui di terreno.

Dopo i lavaggi con PBS, veniva aggiunta una soluzione di tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) per garantire il distacco delle cellule adese sulla superficie della flask. L'utilizzo della tripsina nelle colture cellulari promuove il distacco delle cellule degradando le proteine di adesione, come le caderine, responsabili dell'adesione delle cellule sia sulla superficie della piastra sia con le cellule adiacenti. La tripsina è un enzima proteolitico (serina proteasi) che agisce rompendo i legami peptidici all'estremità carbossilica di specifici aminoacidi, in particolare lisina e arginina.

La soluzione contiene anche EDTA, agente chelante che lega agli ioni metallici come calcio e magnesio, facilitando l'azione della tripsina.

Nello specifico, per le cellule GBM19 la tripsina-EDTA è stata diluita in proporzione 1:3 con aggiunta di PBS per evitare un'azione eccessivamente aggressiva che potesse danneggiare la coltura cellulare. Le piastre di coltura venivano incubate a 37°C per 2 minuti, per ridurre al minimo i danni cellulari. Una volta terminata l'incubazione veniva aggiunto del PBS (proporzione 2:1) per inattivare la tripsina e le cellule venivano raccolte in una falcon da 15mL e centrifugate a 600 rpm per 4 minuti. Quando le cellule non raggiungono un'elevata confluenza, viene aggiunto 1mL di terreno di coltura fresco, per garantire alle cellule un apporto di nutrienti adeguato.

Lo stato della coltura cellulare è stato monitorato utilizzando la microscopia in campo chiaro a contrasto di fase.

3.3 CONTEGGIO CELLULARE

Dopo la centrifugazione, il pellet formato veniva risospeso in terreno di coltura fresco. Successivamente, 10 µL di sospensione cellulare venivano trasferiti in una microprovetta Eppendorf da 0,5 mL, e miscelati con 10 µL di *Trypan Blue* 0,4 % (Sigma-Aldrich), con rapporto 1:1. Successivamente, 10 µL della miscela ottenuta venivano caricati su vetrini di vetro riutilizzabili *Countess™ II FL Reusable Glass Slides* (Thermo Fisher Scientific), contenenti due camere di conteggio. La concentrazione cellulare finale era quindi determinata dalla media dei due valori ottenuti, utilizzando il contatore cellulare automatizzato *Countess™* (Thermo Fisher Scientific), che consente il conteggio di cellule vive e morte per 1 mL.

3.4 CONGELAMENTO DELLE CELLULE

A differenza delle linee cellulari immortalizzate, le colture cellulari primarie hanno una limitata capacità proliferativa e con l'aumentare del numero dei passaggi in coltura, vanno incontro a progressive mutazioni genetiche e fenotipiche, fino a provocarne la morte cellulare.

Per salvaguardare l'integrità della linea cellulare, le cellule venivano congelate nei primi passaggi e conservate per essere utilizzate successivamente per altri esperimenti.

Si tratta di un processo di crioconservazione che utilizza un mezzo di congelamento composto dal 90% di terreno di crescita e dal 10% di Dimetilsolfossido (DMSO, Thermo-Fisher Scientific), il quale agisce come agente crioprotettivo riducendo il punto di congelamento e rallentando la formazione di cristalli di ghiaccio durante il congelamento che possono danneggiare le strutture cellulari, migliorando la sopravvivenza cellulare dopo lo scongelamento.

Una volta determinata la concentrazione delle GBM19, venivano prelevati 900 μ L della sospensione e trasferiti in una criovial, alla quale si aggiungevano 100 μ L di DMSO, goccia per goccia, per evitare possibili fenomeni di shock termico alle cellule. La criovial veniva quindi immediatamente posta nel freezer a -80°C . Trascorse 24 ore a -80°C , le cellule possono essere trasferite in azoto liquido a $-195,8^{\circ}\text{C}$ per la conservazione a lungo termine.

Per garantire una corretta identificazione dei campioni crioconservati, ogni criovial è etichettata riportando il nome della linea cellulare, la data di congelamento, il numero di cellule che contiene e la data di trasferimento in azoto.

3.5 SCONGELAMENTO DELLE CELLULE

Per scongelare le cellule dal freezer -80°C o dall'azoto liquido, si preparava una falcon contenente 9mL di PBS preriscaldato a 37°C . Una piccola quantità veniva aggiunta alla criovial contenente le cellule congelate, per uno scongelamento graduale. L'intero contenuto della criovial poi veniva trasferito all'interno della falcon contenente il rimanente PBS. La sospensione cellulare ottenuta veniva quindi centrifugata con il protocollo standard per le GBM19, e il pellet veniva risospeso in 1 mL di terreno di coltura fresco e finalmente seminato nelle flask.

3.6 FISSAZIONE DELLE CELLULE

Per le procedure di colorazione, le cellule sono state seminate su vetrini copri-oggetto sterile (22 x 22mm) posizionati in piastre per coltura cellulare da 35 mm x 10 mm fino al raggiungimento del 90% di confluenza. Una volta raggiunta la giusta confluenza, le cellule sono state fissate con una soluzione fredda (-20°C) di metanolo e acetone (rapporto 1:1) per 7 minuti. Successivamente i vetrini sono stati trasferiti in una soluzione di PBS 1X al 70% e conservati a 4 °C per almeno 24 ore.

L'utilizzo del metanolo/acetone come fissativo primario è stato scelto perché il metanolo contribuisce al mantenimento della morfologia cellulare, mentre l'acetone aumenta la permeabilità della membrana cellulare, favorendo l'ingresso dei reagenti per la colorazione. Questa combinazione permette di preservare le caratteristiche strutturali delle cellule garantendo allo stesso tempo accessibilità antigenica.

3.7 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA-EOSINA

Terminata la fissazione, le cellule sono state colorate con ematossilina-eosina (H&E) per poter osservare la morfologia cellulare.

Per prima cosa, le cellule sono state incubate con ematossilina (Sigma-Aldrich) per 5-7 minuti, poi sono stati eseguiti dei lavaggi con PBS 1x per rimuovere il colorante in eccesso. Successivamente è stata aggiunta l'eosina (Sigma-Aldrich) per 10 secondi, seguita da un ulteriore lavaggio per eliminare i residui. Terminata la colorazione, i vetrini copri-oggetti sono stati montanti sui vetrini utilizzando il *Mowiol* (Calbiochem-Inalco). A questo punto, i preparati sono pronti per l'osservazione al microscopio ottico.

3.8 MICROSCOPIA A CONTRASTO DI FASE

Le cellule GBM19 sono state osservate mediante microscopia a contrasto di fase, che permette di osservare cellule vive e non colorate, consentendo di valutare la morfologia cellulare e il comportamento delle cellule in coltura.

Le immagini sono state acquisite mediante un sistema digitale e utilizzate per l'analisi della morfologia cellulare.

3.9 SAGGIO DELL'MTT

Per valutare la crescita o la proliferazione cellulare è stato utilizzato il saggio colorimetrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolio bromuro; blu di tiazolile], basato sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di ridurre l'MTT, un sale di tetrazolio giallo e solubile in acqua, in cristalli di formazano, l'enzima responsabile di convertire MTT in formazano nelle cellule vitali è il succinato deidrogenasi mitocondriale NAD(P)H-dipendente. La quantità di formazano prodotta risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti nel campione (Ghasemi et al., 2021; Grela et al., 2015).

Il formazano è insolubile e presenta una colorazione viola/blu scuro, viene quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 550nm.

L'MTT in polvere diluito in PBS 1X fino al raggiungimento di una concentrazione finale di 5mg/ml. Poiché il reagente è fotosensibile, la soluzione è stata preparata e conservata in frigorifero a +4° C in modo che possa rimanere stabile per almeno un mese.

Per eseguire il saggio, le cellule sono state seminate in piastre multiwell da 96 pozzetti alla densità di 1×10^4 cellule per pozzetto in 100 μ L di terreno di coltura. Per la linea cellulare GBM19 è stato utilizzato *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) ad alto contenuto di glucosio (EuroClone) a cui verrà aggiunta una miscela di nutrienti F12 (Euroclone), l'integratore di vitamina B27™1X (Thermo Fisher Scientifics), 10ng/mL di fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) (Sigma-Aldrich), 20ng/mL di fattore di crescita epidermico umano (EGF) (Sigma-Aldrich), Penicillina/Streptomicina 100x (Thermo Fisher Scientifics) e l'MTT (HelloBio).

Per valutare l'effetto del bepridil, a partire da una soluzione madre alla concentrazione di 100 μ M sono state preparate diluzioni seriali del farmaco, successivamente aggiunte ai pozzetti contenuti le cellule GBM19. Le cellule sono state incubate con le diverse concentrazioni di bepridil per 48 ore.

Successivamente, sono stati aggiunti 10 μ L di soluzione madre MTT per ciascun pozzetto, corrispondenti a 1/10 del volume totale del terreno di coltura. Le piastre sono state incubate a 37°C per 3 ore, il tempo di incubazione dipende dalla tipologia di cellule coltivate.

All'interno della piastra sono presenti pozzetti di controllo e pozzetti contenuti il farmaco da testare alle diverse concentrazioni.

Al termine dell'incubazione, il mezzo di coltura è stato rimosso delicatamente dai pozzetti, facendo attenzione a non aspirare i cristalli di formazano, che appaiono come precipitato viola/blu scuro, depositati sul fondo della piastra. Dopodiché sono stati aggiunti 100 μ L di DMSO in ogni pozzetto per solubilizzare i sali di formazano.

La lettura dell'assorbanza dei campioni è stata misurata a 550 nm mediante un lettore multimodale per micropiastre (PerkinElmer Multimode Plate Reader, PerkinElmer Inc.). I valori ottenuti sono stati utilizzati per calcolare la vitalità cellulare, espressa come percentuale di controllo (controllo =100% vitalità).

In questo studio, il test dell'MTT è stato utilizzato per valutare l'effetto del bepridil, bloccante di NCX, sulla vitalità delle cellule GBM19, al fine di determinare la concentrazione appropriata per gli esperimenti successivi.

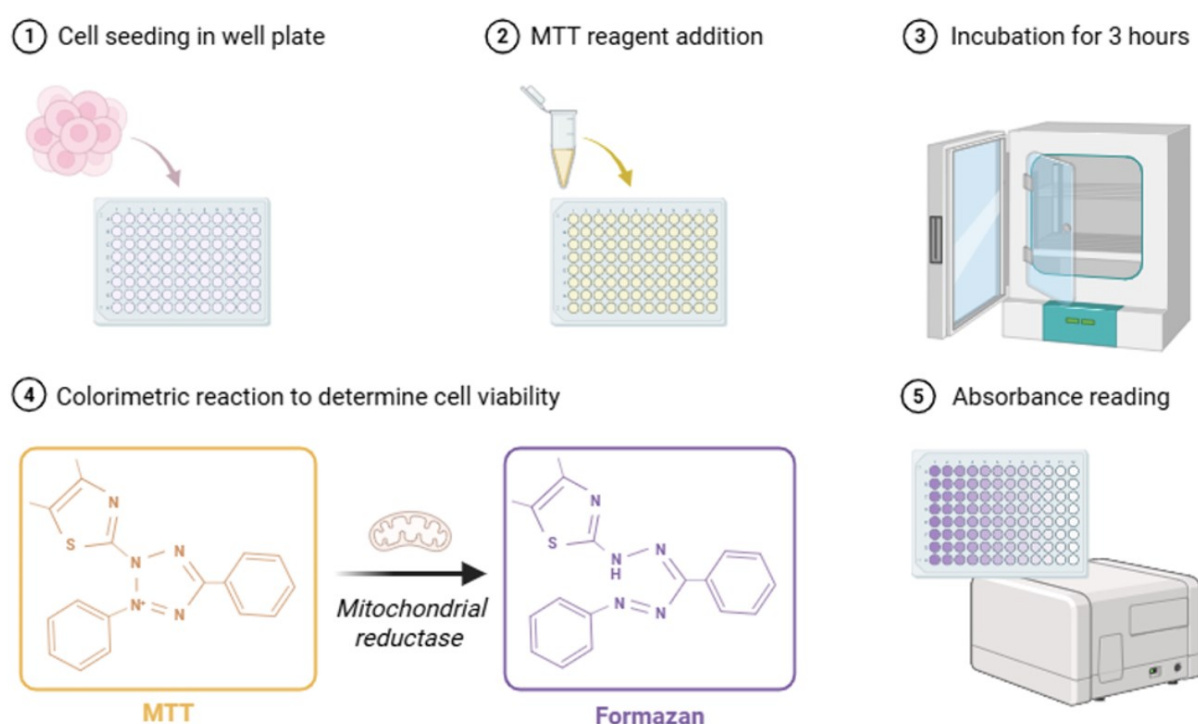


Figura 5. Le Fasi del saggio dell'MTT. Importato da BioRender.com.

3.10 SAGGIO DEL *WOUND-HEALING* E MICROSCOPIA *TIME-LAPSE*

Per valutare la migrazione delle cellule *in vitro*, le GBM19 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e coltivate fino a raggiungere la confluenza desiderata del 90%. A questo punto, al centro di ciascun pozzetto è stato effettuato lo *scratch* con un puntale da 200 μ L (Figura 6). Tutte le procedure vengono eseguite sotto cappa a flusso laminare per garantire condizioni di sterilità.

In seguito alla formazione del graffio, a 0 h, si la larghezza dello *scratch* è stata registrata e monitorata nel tempo fino alla completa chiusura della ferita.

Dopo la formazione dello *scratch*, le cellule sono state mantenute sia in condizioni di controllo (CTR) sia trattate con bepridil (6.25 μ M), al fine di valutare l'effetto dell'inibizione di NCX sulla migrazione cellulare.

In base alla posizione delle cellule rispetto al graffio, sono state identificate tre popolazioni cellulari:

- Le *leading-edge cells*, localizzate al fronte migratorio e coinvolte nella chiusura della ferita;
- Le *loop cells*, localizzate al fronte migratorio presentanti una morfologia ad anello;
- Le *extra cells*, localizzate lontano dal fronte migratorio.

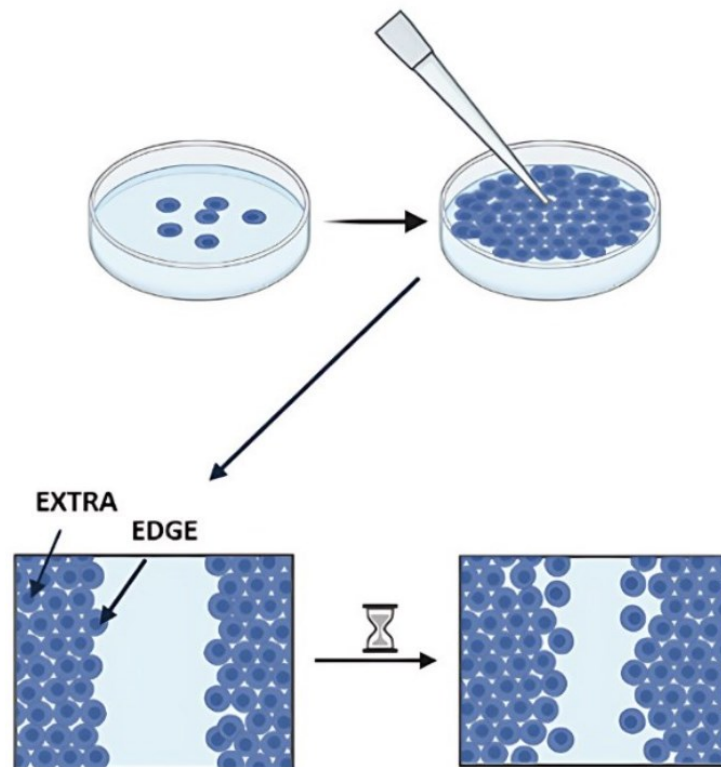


Figura 6. Saggio del *Wound-healing*. Dopo la creazione dello *scratch*, le cellule migrano progressivamente verso lo spazio libero fino a chiudere la ferita. (Immagine creata con BioRender.com)

Per monitorare la chiusura dello scratch è stata utilizzata la microscopia *time-lapse*, una tecnica di imaging che consente l'acquisizione di immagini a intervalli regolari per osservare processi cellulari dinamici nel tempo, come la migrazione, i cambiamenti morfologici e l'organizzazione cellulare.

Dopo lo *scratch*, la piastra contenente le cellule viene inserita in una camera di coltura personalizzata montata su un supporto automatizzato posizionato su un oculare capovolto del microscopio a contrasto di fase (*Leica DMI8S*, obiettivo 10x) (Figura 7). La piastra è protetta grazie alla presenza di un rivestimento di pennelli di policarbonato collegati a tubi di riciclo dell'aria, e la presenza di una camera di incubazione garantisce il mantenimento delle condizioni fisiologiche adeguate:

- Temperatura a 37°C per favorire il normale metabolismo cellulare e la funzione enzimatiche,
- Atmosfera al 5% di CO₂ per regolare il pH del terreno di coltura tamponato con bicarbonato, per prevenire lo stress cellulare,
- Mantenimento dell'umidità per evitare l'evaporazione del terreno di coltura.

Le immagini sono state acquisite ad intervalli di 20 minuti, fino alla chiusura completa della ferita. Successivamente, le sequenze di immagini ottenute sono state elaborate in *time-lapse*, consentendo di osservare il comportamento cellulare nel tempo.

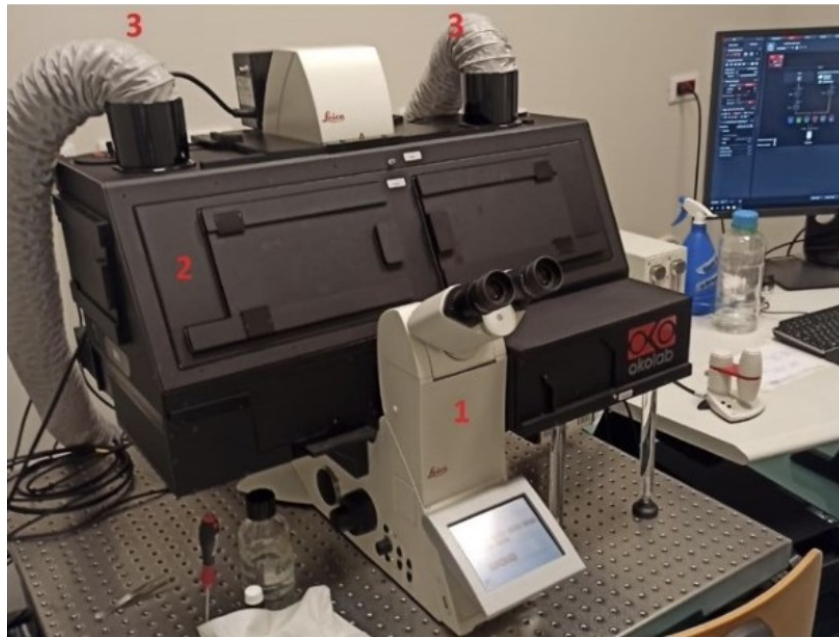


Figura 7. Microscopio time-lapse. (1) sistema ottico, (2) camera di incubazione, (3) sistema di ventilazione.

3.11 ANALISI TIME-LAPSE

Le analisi sono state eseguite con il software *ImageJ*, utilizzando la funzione plugin “*manual tracking*”. Per il tracciamento delle cellule, sono impostati i seguenti parametri: intervallo temporale tra i fotogrammi pari a 20 minuti, calibrazione spaziale x/y di 1 µm, calibrazione z pari a 0 µm, dimensione del quadrato impostata a 0, larghezza della linea pari a 3 dimensione frontale a 12. Una volta impostati i parametri, le cellule possono essere tracciate manualmente con l'opzione “*add track*”, prendendo i singoli nucleoli come bersagli di imaging poiché sono marcatori stabili e facilmente identificabili. Il tracciamento è stato eseguito seguendo la singola cellula in ciascun fotogramma fino alla chiusura completa del graffio.

Il tracciamento manuale ha consentito di ottenere un file contenente i diversi parametri di motilità cellulare, tra cui le coordinate spaziali, la distanza percorsa tra due tempi consecutivi e la velocità di

migrazione. I dati ottenuti sono stati esportati su Excel ed analizzati statisticamente mediante il software *GraphPad Prism*.

3.12 IMMUNOFLUORESCENZA

La tecnica dell'immunofluorescenza è stata utilizzata per analizzare l'espressione e la localizzazione delle proteine di nostro interesse.

Le cellule GBM19 sono state seminate su un vetrino copri-oggetti (22 mm x 22 mm) inseriti all'interno di piastre da coltura (35 mm x 10 mm) e lasciate crescere fino a raggiungere il 90 % della confluenza. Successivamente, le cellule sono state fissate (vedi Materiali e Metodi 1.6) e incubate per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di albumina sierica bovina (BSA, Thermo Fisher Scientific) all'1% in PBS, per bloccare i siti di legame aspecifici. I vetrini sono poi stati incubati per circa due ore a temperatura ambiente con anticorpi primari specifici:

- *anti-VE-cadherin* derivato da coniglio, diluito 1:1000 in PBS/BSA (#ab33168 anticorpo policlonale di coniglio anti-VE-caderina, ABCAM).
- *anti-vinculin* derivato da coniglio, diluito 1:1000 in PBS/BSA (#ES1172 anticorpo policlonale di coniglio anti-vinculina, ELK biotechnology).
- *anti-NCX1* derivato da topo, diluito 1: 200 in PBS/BSA (#MA3-926, anticorpo monoclonale di topo anti-scambiatore sodio-calcio SLC8A1, Thermo Fisher Scientific).

Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari, i vetrini coprioggetti sono stati lavati con PBS 1X, e successivamente incubati per 1 ora al buio con anticorpi secondari anti-coniglio e anti-topo coniugati a fluorofori (*Alexa Fluor 594*, Thermo Fisher Scientific), con siti specifici per gli anticorpi primari precedentemente utilizzati.

Contestualmente all'incubazione con anticorpi secondari, è stata eseguita la colorazione delle membrane utilizzando la *Phalloidin* coniugata con un fluoroforo (*Alexa Fluor 488* diluito 1:700 in PBS/BSA, Thermo Fisher Scientific).

Successivamente sono stati eseguiti lavaggi con PBS 1X, e i nuclei sono stati colorati con 0.1 µg/ml di Hoechst 33258 (diluito 1:5000, Sigma-Aldrich), un agente intercalante del DNA. Infine, i campioni sono stati montati sui vetrini utilizzando un mezzo di montaggio *Mowiol* (*Calbiochem-Inalco*), lasciandoli ad asciugare per una notte prima dell'analisi.

L'acquisizione delle immagini è stata quindi effettuata mediante un microscopio confocale a scansione laser (*Olympus BX51*). Il microscopio è dotato di una serie di laser che consentono di eccitare in sequenza diversi fluorofori, con lunghezze d'onda specifiche selezionate in base agli spettri di assorbimento dei rispettivi fluorofori utilizzati nell'esperimento.

Per il rilevamento dei fluorofori associati agli anticorpi *anti-VE-Cadherin*, *anti-vinculin* e *anti-NCX1*, la lunghezza d'onda di eccitazione è di 594 nm, con emissione rilevata nel canale rosso a 618 nm.

Per il fluoroforo legato alla *Phalloidin* la lunghezza d'onda di eccitazione è di 488 nm, con emissione nel canale del verde a 525 nm. Infine, per la colorazione nucleare con Hoechst la lunghezza d'onda di eccitazione è di 350 nm e la sua emissione è raccolta in un canale blu separato.

Le immagini sono state acquisite come sezioni ottiche per eliminare la luce fuori fuoco e ottenere immagini ad alta risoluzione. Successivamente, le immagini dei singoli canali sono state sovrapposte per ottenere un'immagine composita, consentendo di visualizzare la distribuzione delle proteine.

L'analisi delle immagini è stata eseguita utilizzando il software *ImageJ*. Tutte le immagini sono state convertite in formato a 8-bit per standardizzare la scala di intensità dei pixel, successivamente, sono state definite regioni di interesse (ROI) per ciascuna misurazione, per garantire un'analisi quantitativa uniforme. Per ogni condizione è stato selezionato e analizzato un numero fisso di ROI, e il software ha restituito i valori medi di intensità di immunopositività relativi ai marcatori utilizzati: Hoechst, *anti-Phalloidin*, *anti-VE-cadherin* e *anti-NCX1*.

3.13 SFEROIDI

Per la formazione degli sferoidi tumorali, le GBM19 sono state inizialmente staccate dalla flask di coltura, contate e risospese nel mezzo di coltura.

Le cellule sono state seminate in piastre multiwell a 96 pozzetti con fondo rotondo (U wells), con una densità di 1×10^4 cellule/mL. In ogni pozzetto sono stati inseriti 200 μ L di sospensione cellulare; e nei pozzetti periferici è stato aggiunto PBS al fine di mantenere un'adeguata umidità e prevenire l'evaporazione del mezzo di coltura.

Terminata la procedura, la piastra è stata incubata per 96 ore a 37°C in incubatore, per garantire la formazione degli sferoidi tridimensionali.

Successivamente, per valutare la capacità invasiva, è stato fatto un saggio di invasione su Matrigel, che simula la matrice extracellulare. Gli sferoidi sono stati incubati con Matrigel per un'ora. Sono state generate condizioni di CTR e condizioni trattate con 6.25 μ M di bepridil, al fine di valutare l'effetto dell'inibizione di NCX1 sull'invasività cellulare.

Gli sferoidi sono stati monitorati nel tempo a 0h e 72h mediante microscopia ottica, per valutare la capacità di invasione e dispersione cellulare.

Le immagini ottenute sono poi state analizzate e quantificate con il software ImageJ.

3.14 ANALISI STATISTICHE

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, California), con cui sono state calcolate le medie e gli errori standard, e i risultati sono stati rappresentati graficamente. Tutti i dati ottenuti dall'analisi statistica sono stati inclusi.

Per valutare le differenze statistiche tra le condizioni sperimentali sono stati utilizzati dei test appropriati, tra cui il one-way ANOVA, il two-way ANOVA e i t-test per confronti multipli. Per correggere i confronti multipli è stata utilizzata la correzione di Bonferroni.

Le analisi statistiche sono considerate significative se $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 FORMAZIONE DI STRUTTURE *VASCULOGENIC MIMICRY-LIKE* NELLE CELLULE GBM19

Per studiare il comportamento di crescita delle cellule GBM19 è stata condotta un'analisi morfologica dopo 72 ore dalla loro semina (Materiali e Metodi, 3.1) (Figura 8).

L'osservazione è avvenuta sia mediante microscopia a contrasto di fase, sia in seguito a colorazione con ematossilina-eosina.

Come visibile in Figura 8, le GBM19 crescono in monostrato aderendo alla piastra di coltura, con la formazione, da parte di alcune cellule, di strutture circolari cave (*loops*) (Figura 8, A, B, D) che presentano un diametro medio di $133 \pm 7.38 \mu\text{M}$ (Figura 8, C).

Le cellule che formano i *loops* mostrano movimenti di tipo rotatorio attorno alle aree prive di cellule: questo tipo di organizzazione è stato associato a processi di migrazione cellulare collettiva, fenomeno osservato durante la progressione tumorale, tipico delle cellule tumorali con fenotipo mesenchimale, caratterizzati da capacità migratoria e invasiva. (Nefel et al., 2019; Trepats & Sahai, 2018; Verhaak et al., 2010). (Trepats & Sahai, 2018).

È stato ipotizzato che queste formazioni circolari osservate nella coltura cellulare potrebbero essere associate ai processi di *vasculogenic mimicry*, un meccanismo attraverso il quale le cellule tumorali organizzano strutture tubulari che non sono vasi sanguigni ma imitano la loro funzione favorendo la crescita progressiva del tumore (Delgado-Bellido et al., 2023).

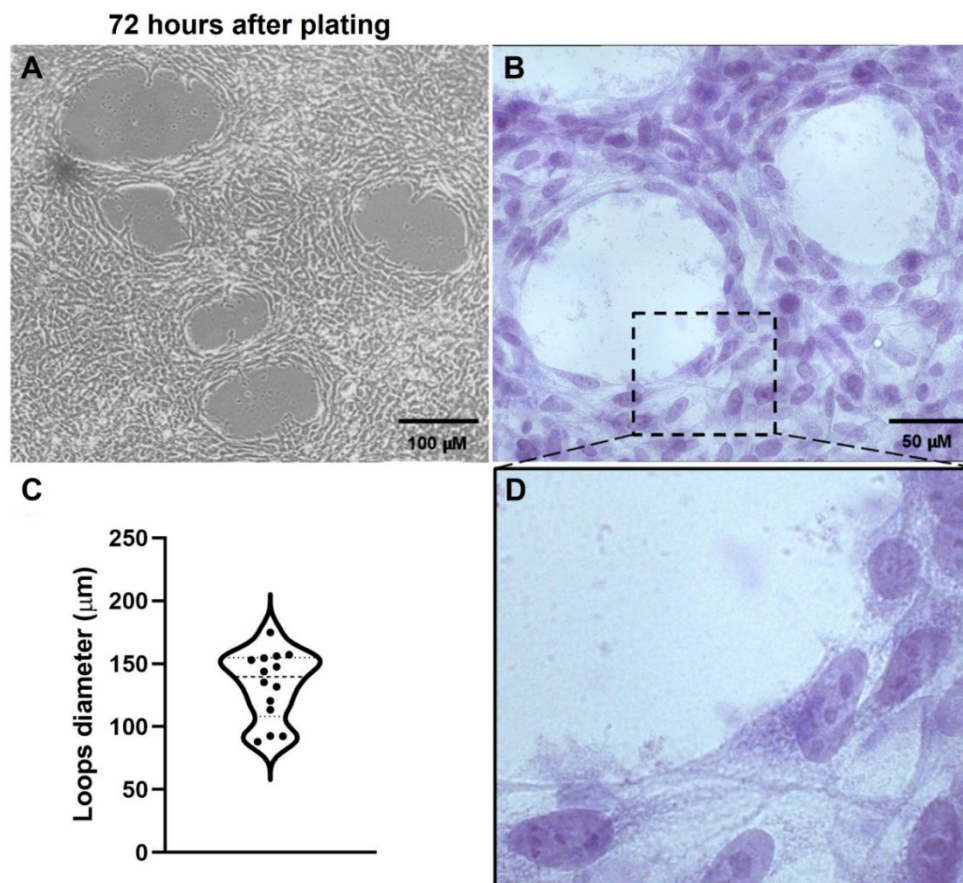


Figura 8. (A) Crescita delle cellule GBM19 in condizioni standard. Le cellule sono state osservate 72 ore dopo la semina cellulare. Immagine al microscopio a contrasto di fase delle cellule GBM19 che mostra la presenza di strutture circolari (*loops*) caratterizzate da aree centrali privi di cellule nella coltura cellulare. Scale bar: 100 μM. (B) Immagine di GBM19 in seguito a colorazione con ematossilina-eosina, che mostra le strutture circolari. Scale bar: 50 μM. (C) Grafico che mostra i diametri dei singoli *loops*. (D) Ingrandimento della figura 1B.

4.2 IL FRONTE MIGRATORIO DELLE GBM19 È CARATTERIZZATO DALLA PRESENZA DI CELLULE *LEADING-EDGE* E *LOOP*

Le cellule tumorali di GBM sono caratterizzate da un'elevata capacità migratoria, che contribuisce alla loro invasività all'interno del parenchima cerebrale. Per studiare queste proprietà migratorie *in vitro*, è stato eseguito il *wound healing assay* sulla linea cellulare GBM19. Dopo la creazione artificiale della ferita (*scratch*) in GBM19, è stata monitorata la loro capacità di migrare verso lo spazio libero fino alla sua chiusura: dopo 4 h e 15 h dallo *scratch*, le cellule localizzate sul fronte migratorio avanzano fino a raggiungere la chiusura completa della ferita a 40 h (Figura 9, A-C).

Durante il processo di migrazione delle GBM19 è stata osservata la presenza di due diversi sottotipi cellulari sul fronte migratorio: le *leading-edge cells*, che presentano dei prolungamenti citoplasmatici

che tendono a muoversi in direzione di chiusura dello scratch, e le *loop cells*, che si muovono lungo il fronte formando le strutture circolari precedentemente osservate (vedi Figura 8). Le cellule localizzate lontano dalla ferita e non coinvolte direttamente nel processo migratorio sono invece state definite *extra cells*.

È stata eseguita inoltre un'analisi di immunofluorescenza con un marcatore specifico utilizzato per evidenziare le membrane, *Phalloidin*, ed un marcatore per i nuclei, *Hoechst*, per mostrare l'organizzazione citoscheletrica associata al processo di migrazione (Figura 9, D, E).

L'analisi quantitativa del processo migratorio ha mostrato che la chiusura della ferita raggiunge quasi il 30% dopo 15 h dallo scratch, e il 100% dopo 40 h (15 ore: 30 ± 1.4 ; 40 ore: $100\% \pm 0$ n = 3, Figura 9, F).

L'analisi dell'organizzazione citoscheletrica mediante immunofluorescenza ha mostrato che le cellule presenti sul fronte migratorio definite *leading-edge cells* mostrano una morfologia allungata, con protrusioni citoplasmatiche orientate verso lo spazio libero (Figura 9 D), mentre le *loop cells* tendono a organizzarsi in strutture circolari compatte.

Per caratterizzare ulteriormente la motilità cellulare delle GBM19, le traiettorie delle singole cellule sono state misurate a partire da registrazioni *time-lapse*: le cellule in condizione di controllo (CTR) mostrano movimenti direzionali orientati verso l'area della ferita, indicando un modello di migrazione persistente e coordinato che porta a una chiusura completa dello scratch, coprendo circa 400 μm di distanza ($371.17 \pm 8.23 \mu\text{m}$, n = 36, Figura 9, G).

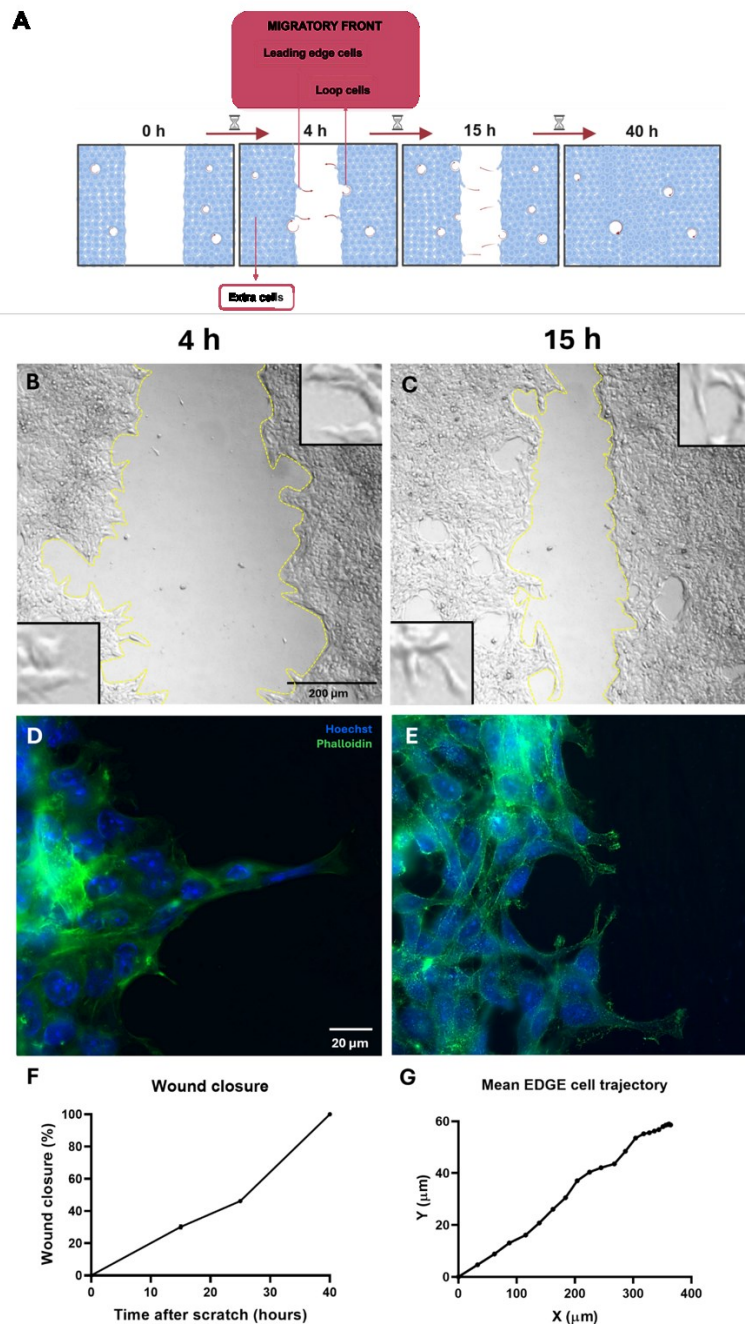


Figura 9. (A) Schema temporale e rappresentazione della chiusura della ferita in diversi tempi (0 h, 4 h, 15 h, 40 h), specificando le diverse tipologie cellulari che si trovano sul fronte migratorio, le *leading-edge cells* e le *loop cells*, e le *extra cells* al di fuori del fronte migratorio. (B-C) Immagine rappresentativa del fronte migratorio rispettivamente a 4 h e 15 h dopo lo *scratch*; è stato evidenziato di giallo il margine della ferita. Scale bar: 200 μm. (D-E) Analisi mediante microscopia a fluorescenza dell'organizzazione citoscheletrica delle cellule sul fronte migratorio. I nuclei sono marcati con *Hoechts* (blu), la membrana cellulare con *Phalloidin* (verde). Scale bar: 20 μm. (F) Analisi quantitativa della chiusura della ferita espressa in percentuale di *wound closure*. (G) Grafico che mostra la traiettoria media delle cellule sul fronte migratorio fino alla chiusura dello *scratch*.

4.3 VE-CADHERIN E VINCULIN SONO ESPRESSE DIFFERENZIALMENTE NELLE CELLULE GBM19 LOOP E LEADING-EDGE

Dopo aver osservato la formazione di strutture circolari da parte delle *loop cells* durante la migrazione delle GBM19, si è ipotizzato un possibile coinvolgimento di queste cellule nei meccanismi associati alla *vasculogenic mimicry* (VM). Per indagare questo aspetto, è stata studiata tramite analisi di immunofluorescenza l'espressione della *VE-cadherin* (rosso), una molecola di adesione tipicamente espressa dalle cellule endoteliali e associata alla formazione di strutture di VM (Breier et al., 2014; Breier & Risau, 1996)(Figura. 10, A). È stata valutata anche l'espressione della *Vinculin* (rosso), proteina associata alle adesioni focali e utilizzata come marker dei processi di adesione e migrazione cellulare (Ziegler et al., 2006) (Figura. 10, B).

Per quantificare l'espressione proteica dei marcatori, è stata misurata l'intensità media di fluorescenza (MFI) per cellula, mostrando che l'espressione di *VE-cadherin* è significativamente più elevata nelle cellule *loop* (MFI: 93.22 ± 5.38 , $n = 20$, Figura 10, C) rispetto alle cellule *leading-edge* (MFI: 21.37 ± 2.36 , $n = 30$; $p < 0.0001$, *unpaired t-test*; Figura 10, C). Allo stesso modo, la percentuale di cellule positive per *VE-cadherin* risulta significativamente maggiore nelle cellule *loop* ($89.68 \pm 5.20\%$, $n = 20$, Figura 10, D) rispetto alle cellule *leading-edge* ($33.33 \pm 8.33\%$, $n = 3$; $p = 0.0046$, *unpaired t-test*; Figura 10, D).

L'analisi della *Vinculin* ha rivelato che, sebbene espressa in entrambi i sottotipi cellulari sul fronte migratorio, la sua intensità di fluorescenza media risulta più elevata nelle cellule *leading-edge* (MFI: 57.16 ± 3.18 , $n = 30$, Figura 10, E) rispetto alle cellule *loop* (MFI: 40.75 ± 2.96 , $n = 17$; $p = 0.0013$, *unpaired t-test*; Figura 10, E). Allo stesso modo, la percentuale di cellule positive per *Vinculin* è significativamente maggiore nelle cellule *leading-edge* ($79.11 \pm 4.5\%$, $n = 3$, Figura 10, F), rispetto alle cellule *loop* ($20.72 \pm 3.1\%$, $n = 3$; $p < 0.0001$, *unpaired t-test*; Figura 10, F).

Questi risultati mostrano che le cellule *loop* presentano un'elevata espressione di *VE-Cadherin*, confermando il loro coinvolgimento nella VM, mentre le cellule *leading-edge* mostrano livelli più elevati di *Vinculin*, restando strettamente associate alla migrazione cellulare.

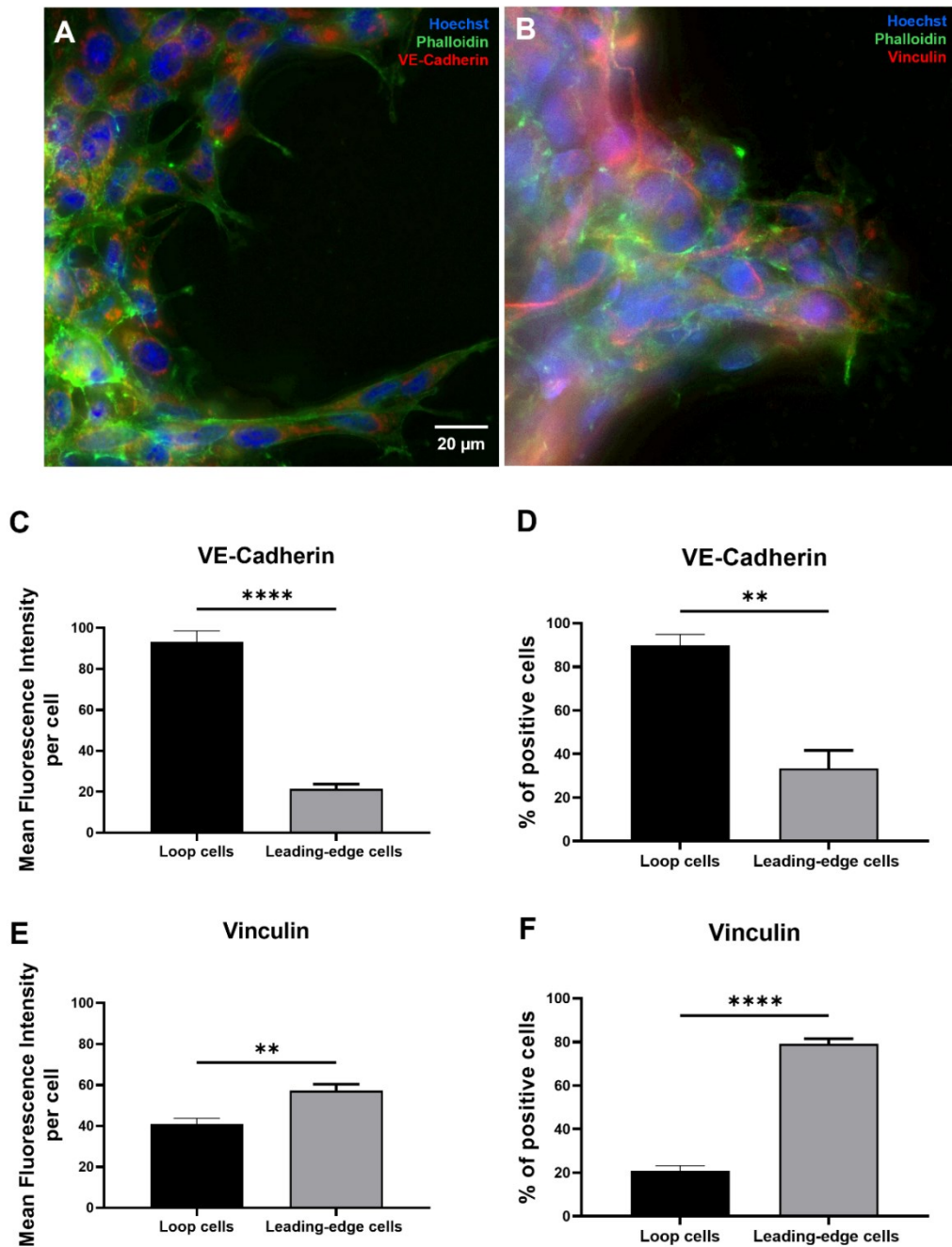


Figura 10. (A) Immagine rappresentativa di immunofluorescenza delle cellule GBM19 marcate con *VE-cadherin* (rosso), la membrana cellulare con *Phalloidin* (verde) e i nuclei con Hoechst (blu). Scale bar: 20 μ m. (B) Immagine rappresentativa di immunofluorescenza delle cellule GBM19 marcate con *Vinculin* (rosso), la membrana cellulare con *Phalloidin* (verde) e i nuclei con Hoechst (blu). Scale bar: 20 μ m. (C, D) Istogramma che mostra l'intensità media di fluorescenza (MFI) della *VE-Cadherin* (C) e la percentuale di cellule *VE-Cadherin* positive (D) in cellule *leading-edge* e *loop*. (E, F) Istogramma che mostra l'intensità media di fluorescenza (MFI) della *Vinculin* (E) e la percentuale di cellule di *Vinculin* (F) in cellule *leading-edge* e *loop*. I valori sono riportati come media $\pm$ SEM. $p^{**} < 0.01$; $p^{****} < 0.0001$.

4.4 LA PROTEINA NCX1 È ESPRESSA SULLA MEMBRANA CELLULARE DELLE CELLULE GBM19 LOCALIZZATE SUL FRONTE MIGRATORIO

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) è stato precedentemente dimostrato essere coinvolto nella migrazione di cellule di GBM immortalizzate (Brandalise et al., 2023). Sulla base di queste evidenze, l'espressione in membrana di NCX1 è stata valutata mediante immunofluorescenza nelle cellule GBM19 localizzate al fronte migratorio (*leading-edge e loop cells*) e nelle cellule non migranti (*extra cells*). Per la marcatura, sono stati utilizzati Hoechst per i nuclei (blu), *Phalloidin* per le membrane cellulari (verde) e un anticorpo monoclonale specifico anti-NCX1 (rosso) (Figura 11, A). Dalle immagini di immunofluorescenza si osserva maggior segnale di NCX1 a livello della membrana plasmatica e in corrispondenza delle protrusioni cellulari coinvolte nei processi migratori (Figura 11, A). Successivamente, sono stati quantificati l'intensità media di fluorescenza del segnale NCX1 e il numero di cellule immunopositive nelle diverse popolazioni cellulari. L'intensità media di fluorescenza (MFI) di NCX1 risulta più alta nelle cellule *leading-edge* (MFI: 74.60 ± 1.85 ; $n = 30$) rispetto alle cellule *loop* (MFI: 43.26 ± 3.42 ; $n = 27$; $p < 0.0001$, *One-Way ANOVA*; Figura 11, B), così come il numero di cellule immunopositive (*leading-edge cells*: 96.67 ± 3.33 %; *loop cells*: 76.67 ± 3.33 %; $n = 3$; $p = 0.0128$, *One-Way ANOVA*). Tuttavia, entrambi i gruppi di cellule sul fronte migratori mostrano un'espressione di NCX1 significativamente più alta rispetto alle cellule localizzate in regioni extra-migratorie sia in termini di MFI (cellule *extra*: MFI: 32.31 ± 3.34 , $n = 47$; *leading-edge* vs. *extra*, $p < 0.0001$; *loop* vs. *extra*, $p = 0.0446$; *One-Way ANOVA*; Figura 11, B) sia di numero di cellule immunopositive (*extra cells*: 66.67 ± 3.33 %; $n = 3$; *leading-edge* vs. *extra*: 0.0017 ; *loop* vs. *extra*: 0.1655).

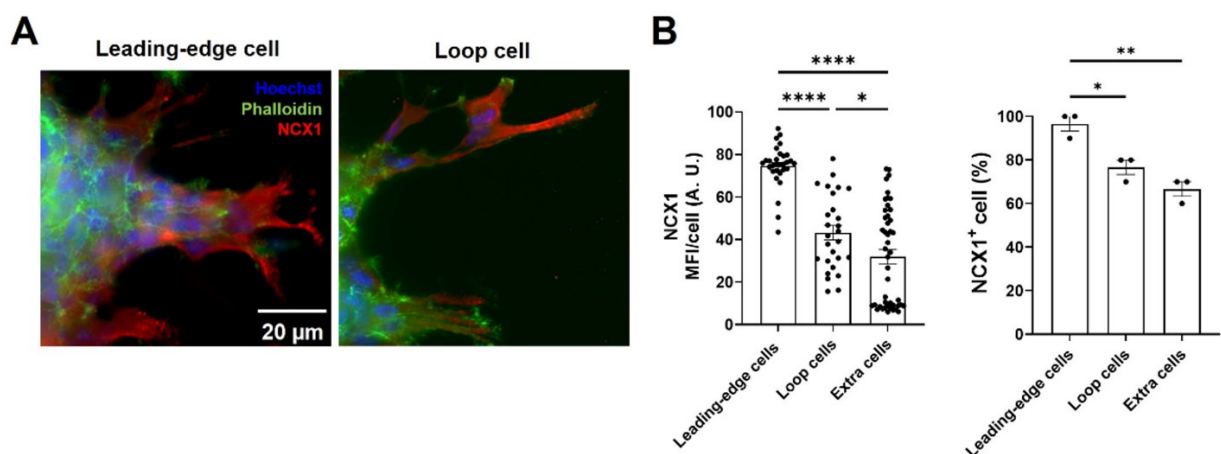


Figura 11. (A) Immagini rappresentative di immunofluorescenza che mostrano l'espressione di NCX1 nelle cellule GBM19 durante la migrazione. Marcatori utilizzati: Hoechst (nuclei, blu) e *Phalloidin* (membrana cellulare, verde), NCX1 (rosso). Scale bar: 20 μm . (B) Istogramma che

compara l'intensità media di fluorescenza (MFI) di NCX1 tra cellule *leading-edge*, *loop* ed *extra*. I valori sono riportati come media $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

4.5 L'INIBIZIONE DI NCX1 BLOCCA LA MIGRAZIONE DELLE CELLULE GBM19 E NE ALTERA L'ORIENTAMENTO DIREZIONALE

L'analisi della migrazione cellulare mediante *wound healing assay* ha evidenziato che, in condizioni di controllo (CTR), le GBM19 sono in grado di chiudere completamente la ferita dello scratch in 40 h (Risultati 4.2, Figura 9, A). Dopo aver evidenziato un'elevata espressione di NCX1 nelle cellule coinvolte nei processi migratori, è stato successivamente indagato il ruolo funzionale di NCX1 nella migrazione delle cellule GBM19.

È stato eseguito un *wound healing assay* con l'aggiunta di bepridil 6.25 μ M, inibitore specifico dello scambiatore, per valutare l'effetto del blocco della funzionalità di NCX1 sulla capacità migratoria delle cellule. È stato eseguito un saggio MTT per valutare la concentrazione di bepridil e identificare una dose non citotossica da utilizzare negli esperimenti successivi (Figura 12). Nelle prime 4 h dopo lo scratch la situazione appare uguale alla condizione di CTR descritta precedentemente (Figura 13, A). Tuttavia, a 40 h si osserva che nelle cellule trattate con bepridil la ferita non si è chiusa, dimostrando una riduzione della capacità migratoria delle cellule GBM19 in presenza dell'inibizione di NCX1 (Figura 13, B). Inoltre, tramite l'immunomarcatura della *Phalloidin* come marcatore di membrana cellulare, è stata analizzata l'organizzazione citoscheletrica delle GBM19 in presenza di bepridil. I risultati mostrano un'alterazione strutturale nelle cellule trattate (Figura 13, C, D), rispetto alla condizione di CTR (Risultati 4.2, Figura 9, D, E), con perdita dei prolungamenti cellulari orientati verso la chiusura dello *scratch*.

L'analisi quantitativa ha evidenziato che nelle prime 15 h dopo lo *scratch*, il tasso di chiusura della ferita è comparabile tra le cellule CTR e quelle trattate con bepridil. Tuttavia, dopo 20 h, mentre le cellule CTR raggiungono il $46.00\% \pm 0.99$ di chiusura, le cellule trattate con *bepridil* presentano solo il $37.86\% \pm 0.52$ ($n = 3$, $p = 0.003$; *two-way ANOVA*; Figura 13, E) di chiusura. La differenza risulta più marcata a 40 h, quando le cellule CTR raggiungono la chiusura completa della ferita (100%), mentre le cellule trattate con bepridil si arrestano all' $81.15\% \pm 0.53$ ($n = 3$, $p < 0.0001$; *two-way ANOVA*; Figura 13, E).

Inoltre, a differenza del CTR, le cellule trattate con bepridil mostrano traiettorie nettamente più corte e disorganizzate, fermandosi a circa metà ferita (179.10μ m). Oltre questo punto, il loro movimento diventa prevalentemente orientato lungo l'asse y, coprendo $180.77 \pm 8.23 \mu$ m ($n = 36$), riflettendo la perdita del movimento direzionale di chiusura della ferita (Figura 13, F).

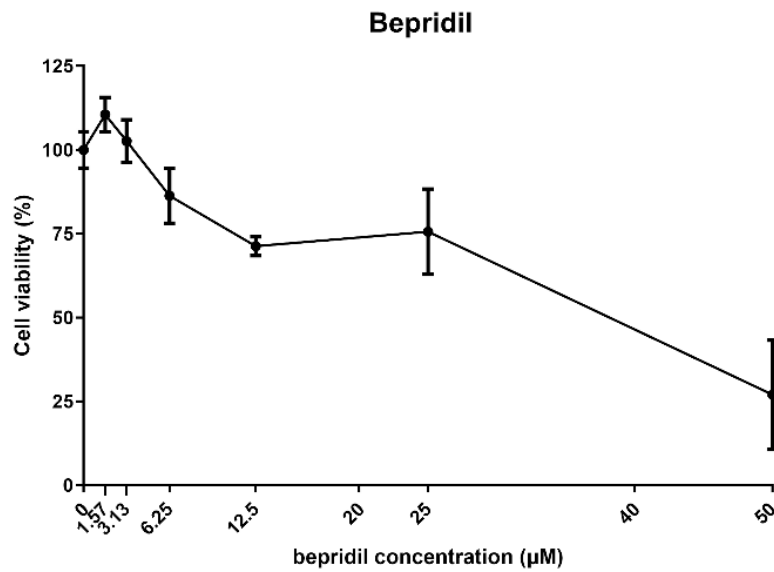


Figura 12. Grafico sulla vitalità cellulare mediante saggio MTT dopo il trattamento con differenti concentrazioni di bepridil. I dati mostrano la percentuale di vitalità cellulare rispetto al controllo. Il saggio è stato utilizzato al fine di identificare una concentrazione di bepridil non citotossica da utilizzare per gli esperimenti successivi.

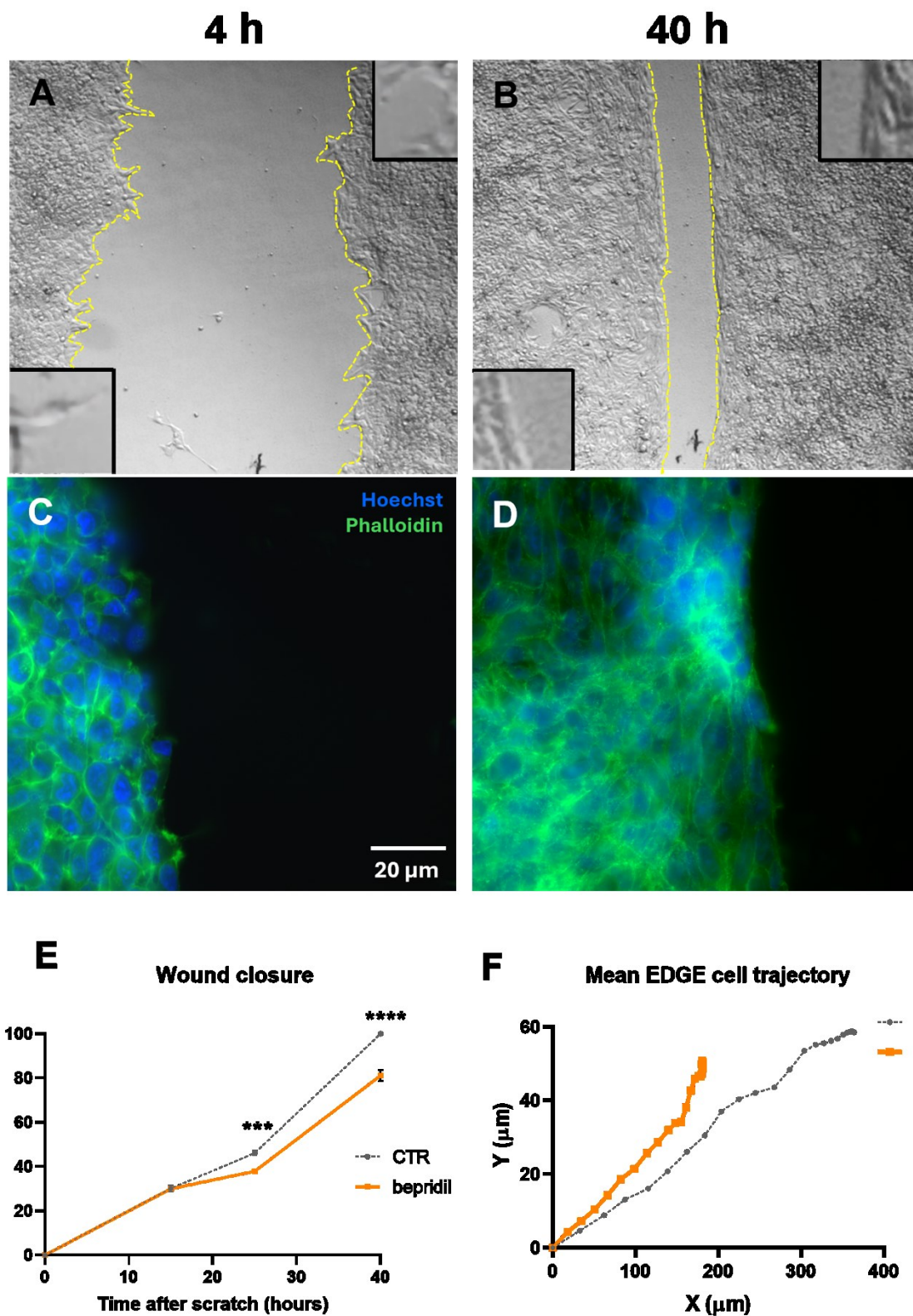


Figura 13. (A-B) Immagini rappresentative del *wound healing* eseguito con l'aggiunta di bepridil, rispettivamente a 4 h e 40 h. Le linee gialle indicano il fronte migratorio delle cellule. (C-D) Immagini rappresentative di immunofluorescenza delle cellule sul fronte migratorio. Marcatori utilizzati: Hoechst (nuclei, blu) e *Phalloidin* (membrana cellulare, verde). Scale bar: 20 μ m. (E) Grafico della chiusura della ferita nel tempo nelle cellule di CTR (tratteggio) e nelle cellule trattate con bepridil

(arancione), espressa in percentuale di *wound closure*. (F) Grafico che mostra la traiettoria media delle cellule CTR (tratteggiato) e trattate con bepridil (arancione) sul fronte migratorio. I valori sono riportati come media $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

4.6 L'INIBIZIONE DI NCX1 ALTERA LA FORMAZIONE E LA CHIUSURA DEI *LOOPS* DURANTE LA MIGRAZIONE DELLE GBM19

Successivamente, è stato investigato l'effetto del bepridil durante la formazione dei *loops* nel corso della chiusura dello scratch (Figura 14). I risultati sono stati confrontati tra le condizioni di controllo (CTR) e trattate con bepridil a diversi time-point: 0 h, 1 h, 4 h, 15 h, 40 h, 72 h (Figura 14 B, C, D).

I *loops* sono stati classificati in diverse categorie:

- *not formed*: gruppi che iniziavano a formare una struttura semicircolare (evolvendo verso loop half formed), ma che durante la chiusura ritornavano a una configurazione lineare senza completarsi;
- *half formed*: loop con struttura a mezzaluna (loop in fase di formazione);
- *completely formed*: loop con struttura circolare completa;
- *closed*: cellule che, oltre a formare il loop, durante il processo migratorio chiudevano anche lo spazio vuoto centrale.

Nelle fasi iniziali (0 h, 1 h, 4 h), la formazione e la chiusura dei *loops* risultavano simili nelle due condizioni; tuttavia, nel corso della chiusura dello scratch sono emerse differenze tra i due gruppi. In particolare, a 40 h, tutti i *loops* nelle cellule CTR risultavano *closed*, mentre nelle cellule trattate con bepridil la popolazione era ancora eterogenea: il 23.42% *not formed*, il 3.81% *half formed*, il 38.02% *completely formed* e solo il 34.75% *closed*.

La differenza più evidente tra le due condizioni è stata osservata a 72 h, quando le cellule trattate con bepridil presentavano il 23,42% di *not formed*, il 7.52% di *half formed*, il 26,69% di *completely formed* e il 42.37% di *closed*.

Inoltre, è stata osservata una differenza nel diametro dei *loops* tra le due condizioni a 40 h: mentre il 100% dei *loops* nelle cellule CTR risultava *closed*, nelle cellule trattate con bepridil i *loops* presentavano ancora un diametro medio di 117.61 μm (± 18.24 ; $n = 3$; two-way ANOVA, $p\text{-value} = 0.0036$), che a 72 h rimaneva pari a circa 69.36 μm (± 36.94 ; $n = 3$; Figura 14, D).

Questi risultati indicano che, nella condizione di controllo, i *loops* aumentano di dimensione durante la migrazione cellulare e, una volta formata una struttura circolare completa, sono in grado di

chiudersi; al contrario, in presenza di bepridil, i *loops* rimangono più ampi e non riescono a completare correttamente la loro formazione.

Nel complesso, questi dati confermano il ruolo di NCX1 non solo nelle cellule che migrano in avanti per la chiusura dello scratch, ma anche nei *loops* coinvolti nel processo di *vasculogenic mimicry* che si formano durante la migrazione cellulare.

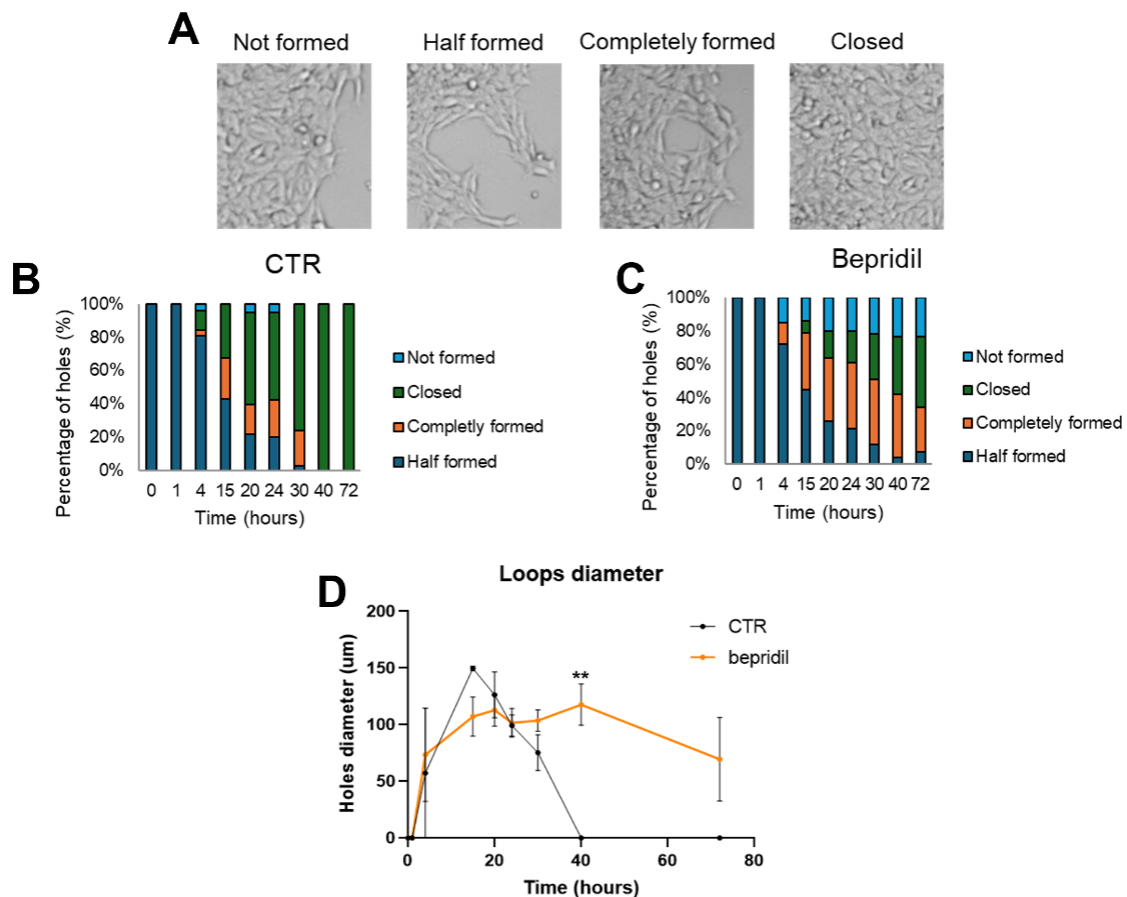


Figura 14. effetto del bepridil nella formazione dei *loop*. (A) Immagini ottenute mediante microscopia a contrasto di fase dei gruppi cellulari considerati nell'analisi sperimentale. (B) Risultati dei dati time-lapse (CTR), suddivisi in diverse condizioni: *half-formed loops*, *completely formed loops*, *closed loops*, and *not formed loops*. (C) Risultati dei dati time-lapse relativi alle cellule GBM19 precedentemente trattate con bepridil, nelle stesse condizioni del controllo (B). (D) Grafico che indica il diametro dei loop in funzione del tempo successivo allo scratch.

4.7 L'INIBIZIONE DI NCX1 RIDUCE LA CRESCITA E L'INVASIONE DEGLI SFEROIDI TUMORALI

Per valutare l'effetto dell'inibizione di NCX1 in un modello più complesso che meglio rassomiglia la complessità della massa tumorale, sono stati utilizzati sferoidi tumorali tridimensionali ottenuti a partire dalle GBM19. Gli sferoidi sono un modello *in vitro* 3D, che permettono di riprodurre in modo più realistico le condizioni di un tumore rispetto alle comuni colture cellulari 2D, consentendo alle cellule di mantenere delle interazioni tridimensionali simili a quelle di un tessuto tumorale (Friedrich et al., 2009).

Gli sferoidi tumorali sono stati osservati in condizione di CTR a 0 h e 72 h, osservando una progressiva crescita con la formazione di prolungamenti cellulari invasivi. Al contrario, gli sferoidi trattati con bepridil 6.25 μ M, mostrano a 72 h una crescita più limitata e una ridotta formazione di prolungamenti cellulari (Figura 15, A).

L'analisi quantitativa ha mostrato che dopo 72 h, gli sferoidi CTR mostrano un aumento significativo dell'area (0 h: $834 \pm 184.8 \mu\text{m}^2$, n = 7; 72 h: $20.125 \pm 7.777 \mu\text{m}^2$, n = 8; p = 0.0065, *One-Way ANOVA*; Figura 15, B). Al contrario, gli sferoidi trattati con bepridil mostrano un'espansione dell'area marcatamente ridotta (0 h: $932.4 \pm 255.9 \mu\text{m}^2$, n = 7; 72 h: $4.628 \pm 911.6 \mu\text{m}^2$, n = 14; p = 0.8722, *One-Way ANOVA*; Figura 15, B), indicando un decremento significativo della crescita degli sferoidi rispetto al CTR (p = 0.0114, *One-Way ANOVA*; Figura 15, B). Per studiare l'effetto dell'inibizione di NCX1 sulla capacità invasiva degli sferoidi è stato eseguito un saggio d'invasione. L'analisi mostra che sia la lunghezza dell'invasione che l'area invasa sono significativamente ridotte in presenza di bepridil. In particolare, a 72 h, gli sferoidi trattati con *bepridil* mostrano una lunghezza dei processi invasivi ridotta (CTR: $31.75 \pm 5.48 \mu\text{m}$, n = 8; bepridil: $18.26 \pm 2.74 \mu\text{m}$, n = 14; p = 0.0292, *unpaired t-test*; Figura 15, C) rispetto al CTR. Allo stesso modo, l'area di invasione risulta significativamente inferiore (CTR: $7164 \pm 1.083 \mu\text{m}^2$, n = 8; bepridil: $2103 \pm 27.1 \mu\text{m}^2$, n = 14; p < 0.0001, *unpaired t-test*; Figura 15, D) rispetto al CTR.

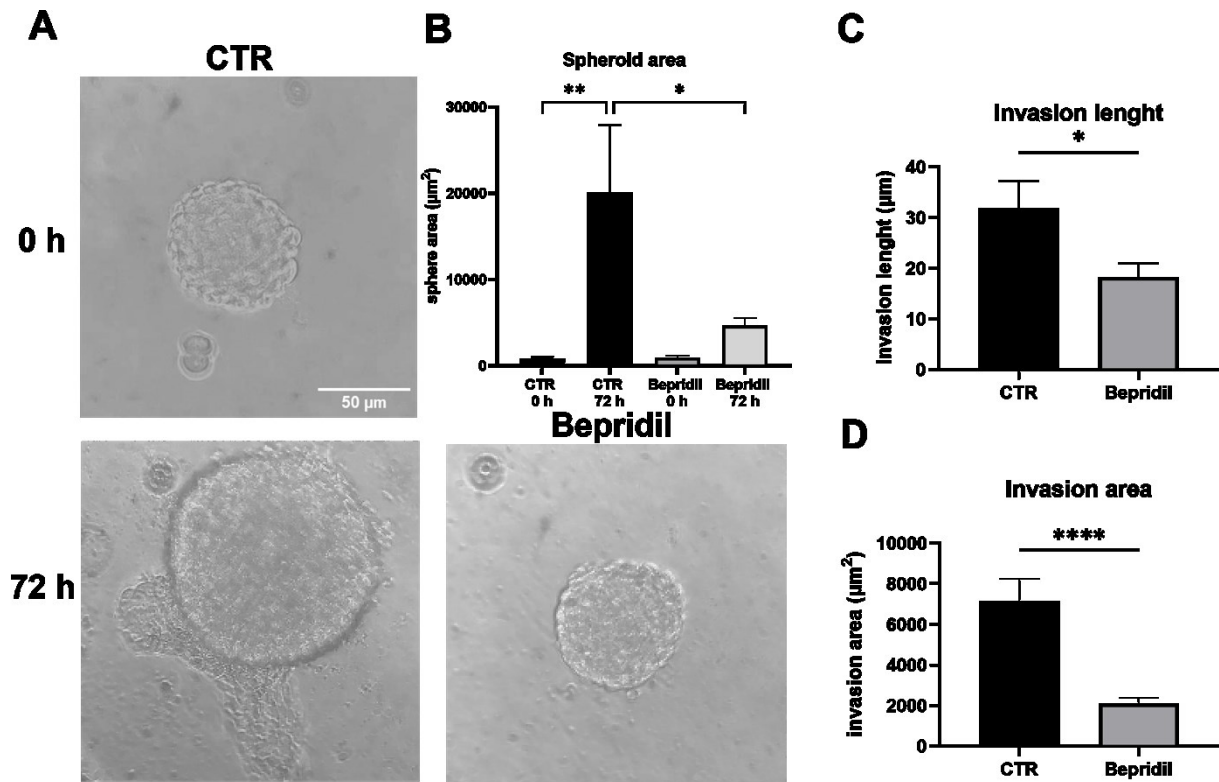


Figura 15. (A) Immagini rappresentative del test d'invasione degli sferoidi in condizioni CTR a 0 h, 72 h e in presenza di bepridil a 72 h. Scale bar: 50 μm . (B) Istogramma dell'area degli sferoidi nelle condizioni CTR e bepridil a 0 e 72 h. (C) Istogramma della lunghezza dell'invasione in condizioni CTR e bepridil a 72 h. (D) Istogramma dell'area di invasione nelle condizioni CTR e bepridil a 72 h. I dati sono espressi come media $\pm$ SEM. *unpaired t-Test*, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

5. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano i precedenti studi condotti dal Laboratorio di Neurobiologia e Fisiologia Integrata dell'Università di Pavia, nei quali era stato evidenziato il coinvolgimento di NCX1 nella migrazione della linea cellulare immortalizzata U251 (Brandalise et al., 2023). Tuttavia, l'impiego di una linea cellulare immortalizzata rappresenta una limitazione nello studio dei meccanismi cellulari e molecolari del tumore, poiché tali caratteristiche non sempre vengono mantenute in seguito al processo di immortalizzazione.

Lo scopo principale di questo lavoro è stato quello di approfondire il ruolo dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) nella migrazione cellulare e nel fenomeno del mimetismo vascolare nelle cellule primarie GBM19, un modello biologicamente più rappresentativo dell'eterogeneità tumorale rispetto alle linee immortalizzate. Le GBM19 appartengono al sottotipo mesenchimale, caratterizzato da elevata aggressività, invasività, plasticità fenotipica e resistenza ai trattamenti terapeutici. Queste caratteristiche hanno reso tale modello adatto allo studio dei meccanismi coinvolti nella progressione e migrazione tumorale.

Durante gli esperimenti è stata osservata la formazione spontanea di strutture cellulari ad anello "*loops*", sia durante la crescita cellulare sia durante i processi migratori. La presenza di queste strutture risulta interessante poiché ricorda organizzazioni cellulari descritte dalla *vasculogenic mimicry* (VM). La VM rappresenta uno dei meccanismi alternativi di vascolarizzazione tumorale associati ai tumori molto aggressivi, come il glioblastoma, consentendo alle cellule tumorali di organizzarsi in strutture simil-vascolari (Delgado-Bellido et al., 2023a; Maniotis et al., 1999). Numerosi studi hanno dimostrato come la presenza di VM sia associata a maggiore invasività tumorale, adattamento al microambiente ipossico e prognosi sfavorevole (Delgado-Bellido et al., 2023a; Santoro et al., 2025).

Per determinare il coinvolgimento dei *loops* nei fenomeni di VM, è stata analizzata l'espressione della *Ve-cadherin*, una molecola di adesione tipicamente espressa dalle cellule endoteliali e associata alla formazione di strutture di VM. I risultati ottenuti hanno mostrato un'elevata espressione della *Ve-cadherin* nelle cellule GBM19, supportando l'ipotesi di un coinvolgimento delle *loops cells* nei fenomeni di VM.

Avendo analizzato la capacità migratoria delle cellule GBM19 mediante *wound healing assays* acquisiti in *time-lapse imaging*, è emerso che le cellule localizzate sul fronte migratorio presentano delle differenze morfologiche: in particolare, le *leading-edge cells* sono caratterizzate da una morfologia allungata, con dei prolungamenti citoplasmatici orientati nella direzione della migrazione,

mentre le *loop cells* si organizzano spontaneamente in strutture semicircolari compatte. L'analisi della capacità migratoria delle GBM19 ha mostrato che le cellule in condizione di controllo sono in grado di chiudere la ferita completamente dopo circa 40 h.

Per verificare l'espressione di NCX1 sul fronte migratorio, è stato condotto un esperimento di immunofluorescenza durante un *wound healing assay*, mostrando un'elevata espressione di NCX1 nelle cellule localizzate sul fronte migratorio (sia sulle *leading-edge* sia sulle *loop cells*) rispetto alle cellule localizzate lontano dal fronte migratorio, definite *extra-cells*, suggerendo un coinvolgimento di NCX1 nei processi di migrazione cellulare.

Le cellule GBM19 sono state successivamente trattate con il bepridil, inibitore farmacologico selettivo di NCX, a cui le GBM19 sono risultate sensibili a concentrazioni circa 8 volte più basse rispetto alle cellule immortalizzate U251 (Brandalise et al., 2023). Il trattamento con bepridil ha determinato un'alterazione dell'organizzazione delle cellule sul fronte migratorio e una riduzione della migrazione cellulare nel *wound-healing assay*. Infatti, le cellule trattate con bepridil dopo 15h subiscono un rallentamento della chiusura della ferita rispetto al controllo, e a 40 h lo scratch non risulta completamente chiuso, dimostrando che l'inibizione di NCX1 interferisce direttamente con la capacità migratoria delle cellule GBM19.

Successivamente è stata effettuata un'analisi *time-lapse* che ha evidenziato alterazioni nella dinamica di formazione delle *loops cells* nelle cellule trattate con bepridil. Rispetto alle condizioni di controllo, le cellule trattate mostravano una ridotta capacità di organizzarsi in strutture circolari complete, dimostrando il coinvolgimento di NCX1 non solo nella migrazione cellulare ma anche nei processi di organizzazione strutturale associato al mimetismo vascolare.

In questa tesi è stato inoltre esplorato l'impiego di sferoidi tridimensionali di GBM19 come modello sperimentale *in vitro*. Rispetto alle colture bidimensionali, gli sferoidi consentono di riprodurre in maniera più realistica l'organizzazione strutturale del tumore e la sua capacità invasiva. L'osservazione del comportamento cellulare negli sferoidi ha permesso di supportare ulteriormente il ruolo di NCX1 nei processi invasivi, suggerendo che la regolazione dei canali ionici possa contribuire non solo alla migrazione cellulare nelle colture 2D, ma anche all'invasione della massa tumorale tridimensionale nell'ambiente extracellulare.

Gli sferoidi in condizione di controllo mostrano una crescita nel tempo associata alla formazione di prolungamenti cellulari invasivi, con un aumento sia della lunghezza di invasione sia dell'area invasiva. Al contrario, gli sferoidi trattati con bepridil presentano una crescita limitata, una ridotta formazione di protrusioni cellulari e una diminuzione significativa sia della lunghezza sia dell'area di invasione rispetto al controllo, suggerendo che l'inibizione di NCX1 comprometta la capacità invasiva delle cellule GBM19 nell'ambiente extracellulare.

La migrazione cellulare richiede continui cambiamenti del volume cellulare, riorganizzazione del citoscheletro e formazione di protrusioni di membrana, processi dipendenti dalla regolazione di calcio intracellulare (Catacuzzeno et al., 2015b; Turner et al., 2014). NCX1 potrebbe quindi contribuire alla modulazione dei canali ionici necessari per il mantenimento della dinamica migratoria delle cellule tumorali. La regolazione del Ca^{2+} rappresenta un elemento fondamentale per il controllo della motilità cellulare. Ulteriori studi saranno necessari per indagare i meccanismi attraverso cui NCX1 contribuisce alla migrazione tumorale e per definire il ruolo del calcio intracellulare in questo processo.

I risultati ottenuti indicano che NCX1 possa svolgere un duplice ruolo nel GBM mesenchimale, contribuendo sia alla migrazione cellulare sia all'organizzazione strutturale delle cellule tumorali. Tali evidenze suggeriscono quindi il potenziale interesse di NCX1 come target terapeutico e pongono le basi per futuri studi volti allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

6. CONCLUSIONI

Il glioblastoma multiforme (GBM) rappresenta il tumore cerebrale più aggressivo data la sua elevata capacità infiltrativa e la forte resistenza ai trattamenti terapeutici.

In questo studio è stato approfondito il ruolo dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1 nella migrazione cellulare e nei fenomeni associati al mimetismo vascolare in cellule primarie GBM19, appartenenti al sottotipo mesenchimale. I risultati ottenuti suggeriscono un ruolo chiave di NCX1 nella regolazione della migrazione cellulare e nella formazione di *vasculogenic mimicry*, strutture associate a forte aggressività tumorale.

In questo studio ci si focalizza anche sullo studio di sferoidi tridimensionali di GBM19, che hanno permesso di osservare il comportamento cellulare in un modello sperimentale che più si avvicina alla realtà del tumore, dimostrando che NCX1 regola non solo la migrazione cellulare bidimensionale, ma anche l'invasione tridimensionale tumorale.

Inoltre, la concentrazione di bepridil pari a $6,25 \mu\text{M}$ ottenuta attraverso il saggio MTT come concentrazione non citotossica ma in grado di produrre effetti evidenti sulla migrazione cellulare, è notevolmente inferiore rispetto a quella impiegata nelle cellule immortalizzate U251 (Brandalise et al., 2023). Questa elevata sensibilità al bepridil potrebbe suggerire un maggiore coinvolgimento di NCX1 nei sottotipi di glioblastoma più aggressivi.

Nel complesso, queste evidenze pongono le basi per futuri studi finalizzati a chiarire il ruolo di NCX1 nella progressione del GBM e a valutarne il potenziale come bersaglio terapeutico nelle forme più aggressive e chemioresistenti della malattia, valutando un possibile riposizionamento dei farmaci che agiscono modulando il passaggio di ioni.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, A. (2003). Biology's new dimension. *Nature*, 424(6951), 870–872. <https://doi.org/10.1038/424870a>
- Alexander, S., Koehl, G. E., Hirschberg, M., Geissler, E. K., & Friedl, P. (2008). Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(6), 1147–1154. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0529-1>
- Angom, R. S., Nakka, N. M. R., & Bhattacharya, S. (2023). Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sciences*, 13(11), 1536. <https://doi.org/10.3390/brainsci13111536>
- Ausprunk, D. H., & Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*, 14(1), 53–65. [https://doi.org/10.1016/0026-2862\(77\)90141-8](https://doi.org/10.1016/0026-2862(77)90141-8)
- Beier, D., Schulz, J. B., & Beier, C. P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Molecular Cancer*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-128>
- Berntsson, S. G., Merrell, R. T., Amirian, E. S., Armstrong, G. N., Lachance, D., Smits, A., Zhou, R., Jacobs, D. I., Wensch, M. R., Olson, S. H., Il'yasova, D., Claus, E. B., Barnholtz-Sloan, J. S., Schildkraut, J., Sadetzki, S., Johansen, C., Houlston, R. S., Jenkins, R. B., Bernstein, J. L., ... Melin, B. S. (2018). Glioma-related seizures in relation to histopathological subtypes: a report from the glioma international case–control study. *Journal of Neurology*, 265(6), 1432–1442. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8857-0>
- Bhat, K. P. L., Balasubramanian, V., Vaillant, B., Ezhilarasan, R., Hummelink, K., Hollingsworth, F., Wani, K., Heathcock, L., James, J. D., Goodman, L. D., Conroy, S., Long, L., Lelic, N., Wang, S., Gumin, J., Raj, D., Kodama, Y., Raghunathan, A., Olar, A., ... Aldape, K. (2013). Mesenchymal Differentiation Mediated by NF-κB Promotes Radiation Resistance in Glioblastoma. *Cancer Cell*, 24(3), 331–346. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.001>
- Boyman, L., Williams, G. S. B., Khananshvili, D., Sekler, I., & Lederer, W. J. (2013). NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 59, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.03.012>

- Brandalise, F., Ramieri, M., Pastorelli, E., Priori, E. C., Ratto, D., Venuti, M. T., Roda, E., Talpo, F., & Rossi, P. (2023). Role of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger (NCX) in Glioblastoma Cell Migration (In Vitro). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12673. <https://doi.org/10.3390/ijms241612673>
- Breier, G., Grosser, M., & Rezaei, M. (2014). Endothelial cadherins in cancer. *Cell and Tissue Research*, 355(3), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1851-7>
- Breier, G., & Risau, W. (1996). The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends in Cell Biology*, 6(12), 454–456. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)84935-X](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)84935-X)
- Cao, Z., Bao, M., Miele, L., Sarkar, F. H., Wang, Z., & Zhou, Q. (2013). Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: A systemic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 49(18), 3914–3923. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.07.148>
- Catacuzzeno, L., Caramia, M., Sforza, L., Belia, S., Guglielmi, L., D'Adamo, M. C., Pessia, M., & Franciolini, F. (2015a). Reconciling the discrepancies on the involvement of large-conductance Ca²⁺-activated K channels in glioblastoma cell migration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00152>
- Catacuzzeno, L., Caramia, M., Sforza, L., Belia, S., Guglielmi, L., D'Adamo, M. C., Pessia, M., & Franciolini, F. (2015b). Reconciling the discrepancies on the involvement of large-conductance Ca²⁺-activated K channels in glioblastoma cell migration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00152>
- De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 17(8), 457–474. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51>
- Delgado-Bellido, D., Oliver, F. J., Vargas Padilla, M. V., Lobo-Selma, L., Chacón-Barrado, A., Díaz-Martin, J., & de Álava, E. (2023a). VE-Cadherin in Cancer-Associated Angiogenesis: A Deceptive Strategy of Blood Vessel Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9343. <https://doi.org/10.3390/ijms24119343>
- Delgado-Bellido, D., Oliver, F. J., Vargas Padilla, M. V., Lobo-Selma, L., Chacón-Barrado, A., Díaz-Martin, J., & de Álava, E. (2023b). VE-Cadherin in Cancer-Associated Angiogenesis: A Deceptive Strategy of Blood Vessel Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9343. <https://doi.org/10.3390/ijms24119343>
- Della Monica, R., Cuomo, M., Buonaiuto, M., Costabile, D., Franca, R. A., Del Basso De Caro, M., Catapano, G., Chiariotti, L., & Visconti, R. (2022). MGMT and Whole-

- Genome DNA Methylation Impacts on Diagnosis, Prognosis and Therapy of Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7148. <https://doi.org/10.3390/ijms23137148>
- Djonov, V., Schmid, M., Tschanz, S. A., & Burri, P. H. (2000). Intussusceptive Angiogenesis. *Circulation Research*, 86(3), 286–292. <https://doi.org/10.1161/01.RES.86.3.286>
 - Fang, Q. (2024). The Versatile Attributes of MGMT: Its Repair Mechanism, Crosstalk with Other DNA Repair Pathways, and Its Role in Cancer. *Cancers*, 16(2), 331. <https://doi.org/10.3390/cancers16020331>
 - Feldman, L. (2024). Hypoxia within the glioblastoma tumor microenvironment: a master saboteur of novel treatments. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1384249>
 - Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*, 4(3), 309–324. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
 - Fu, M., Zhou, Z., Huang, X., Chen, Z., Zhang, L., Zhang, J., Hua, W., & Mao, Y. (2023). Use of Bevacizumab in recurrent glioblastoma: a scoping review and evidence map. *BMC Cancer*, 23(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11043-6>
 - Garnier, D., Renoult, O., Alves-Guerra, M.-C., Paris, F., & Pecqueur, C. (2019). Glioblastoma Stem-Like Cells, Metabolic Strategy to Kill a Challenging Target. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00118>
 - Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
 - Giammello, F., Biella, C., Priori, E. C., Filippo, M. A. D. S., Leone, R., D'Ambrosio, F., Paterno', M., Cassioli, G., Minetti, A., Macchi, F., Spalletti, C., Morella, I., Ruberti, C., Tremonti, B., Barbieri, F., Lombardi, G., Brambilla, R., Florio, T., Galli, R., ... Brandalise, F. (2024). Modulating voltage-gated sodium channels to enhance differentiation and sensitize glioblastoma cells to chemotherapy. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01819-z>
 - Gisina, A., Kholodenko, I., Kim, Y., Abakumov, M., Lupatov, A., & Yarygin, K. (2022). Glioma Stem Cells: Novel Data Obtained by Single-Cell Sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14224. <https://doi.org/10.3390/ijms232214224>

- Grela, E., Ząbek, A., & Grabowiecka, A. (2015). Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 7(4), 159–167.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Hess, A. R. , S. E. A. , G. L. M. , C.-K. K. , S. G. B. , S. R. E. , K. M. S. , & H. M. J. (2001). *Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: Role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2)*. *Cancer Research*, .
- Hilge, M. (2012). Ca²⁺ Regulation of Ion Transport in the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 31641–31649. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.353573>
- Holash, J., Wiegand, S. J., & Yancopoulos, G. D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, 18(38), 5356–5362. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203035>
- Jakab, M., & Ritter, M. (2006). Cell Volume Regulatory Ion Transport in the Regulation of Cell Migration. In *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation* (pp. 161–180). KARGER. <https://doi.org/10.1159/000096322>
- Johnson, H., Del Rosario, A. M., Bryson, B. D., Schroeder, M. A., Sarkaria, J. N., & White, F. M. (2012). Molecular Characterization of EGFR and EGFRvIII Signaling Networks in Human Glioblastoma Tumor Xenografts. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(12), 1724–1740. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.019984>
- Khananshvoli, D. (2022). Structure-Based Function and Regulation of NCX Variants: Updates and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 61. <https://doi.org/10.3390/ijms24010061>
- Królikowska, K., Błaszczak, K., Ławicki, S., Zajkowska, M., & Gudowska-Sawczuk, M. (2025). Glioblastoma—A Contemporary Overview of Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment: A Review Article. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(24), 12162. <https://doi.org/10.3390/ijms262412162>

- Kunzelmann, K. (2005). Ion Channels and Cancer. *The Journal of Membrane Biology*, 205(3), 159. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0781-4>
- Lathia, J. D., Mack, S. C., Mulkearns-Hubert, E. E., Valentim, C. L. L., & Rich, J. N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*, 29(12), 1203–1217. <https://doi.org/10.1101/gad.261982.115>
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 80, 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J. K., & Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>
- Liu, X., Zhang, Q., Mu, Y., Zhang, X., Sai, K., Pang, J. C.-S., Ng, H.-K., & Chen, Z. (2011). Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 105(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0578-5>
- 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>
- Lytton, J. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochemical Journal*, 406(3), 365–382. <https://doi.org/10.1042/BJ20070619>
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., & Hendrix, M. J. C. (1999). Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 739–752. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65173-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65173-5)
- Mao, P., Joshi, K., Li, J., Kim, S.-H., Li, P., Santana-Santos, L., Luthra, S., Chandran, U. R., Benos, P. V., Smith, L., Wang, M., Hu, B., Cheng, S.-Y., Sobol, R. W., & Nakano, I. (2013). Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8644–8649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221478110>

- Mayor, R., & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2), 97–109. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>
- Meleiro, M., & Henrique, R. (2025). Epigenetic Alterations in Glioblastoma Multiforme as Novel Therapeutic Targets: A Scoping Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5634. <https://doi.org/10.3390/ijms26125634>
- Molenaar, R. J. (2011). Ion Channels in Glioblastoma. *ISRN Neurology*, 2011, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2011/590249>
- Morales, A., Lachuer, J., Bilbaut, A., Georges, B., Andrieu, J.-L., Diez, J., & Ojeda, C. (2001). Characterization of a Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX1 isoform in bovine fasciculata cells of adrenal gland. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 218(1–2), 41–45. <https://doi.org/10.1023/A:1007289902405>
- 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>
- Nicoll, D. A., Ottolia, M., Goldhaber, J. I., & Philipson, K. D. (2013). 20 Years from NCX Purification and Cloning: Milestones (pp. 17–23). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6_2
- Nobre, A. R., Entenberg, D., Wang, Y., Condeelis, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2018). The Different Routes to Metastasis via Hypoxia-Regulated Programs. *Trends in Cell Biology*, 28(11), 941–956. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.008>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(4), 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Ostrom, Q. T., Francis, S. S., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 21(12), 68. <https://doi.org/10.1007/s11910-021-01152-9>
- Park, J., Son, A., & Zhou, R. (2013). Roles of EphA2 in Development and Disease. *Genes*, 4(3), 334–357. <https://doi.org/10.3390/genes4030334>
- Park, J.-A., Atia, L., Mitchel, J. A., Fredberg, J. J., & Butler, J. P. (2016). Collective migration and cell jamming in asthma, cancer and development. *Journal of Cell Science*, 129(18), 3375–3383. <https://doi.org/10.1242/jcs.187922>

- Politis, A., Stavrinou, L., Kalyvas, A., Boviatsis, E., & Piperi, C. (2025). Glioblastoma: Molecular features, emerging molecular targets and novel therapeutic strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 212, 104764. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104764>
- Pontén, J., & Westermarck, B. (1978). Properties of human malignant glioma cells in vitro. *Medical Biology*, 56(4), 184–193.
- Powter, B., Jeffreys, S. A., Sareen, H., Cooper, A., Brungs, D., Po, J., Roberts, T., Koh, E.-S., Scott, K. F., Sajinovic, M., Vessey, J. Y., de Souza, P., & Becker, T. M. (2021). Human TERT promoter mutations as a prognostic biomarker in glioma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(4), 1007–1017. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03536-3>
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiological Reviews*, 98(2), 559–621. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>
- Ratto, D., Ferrari, B., Roda, E., Brandalise, F., Siciliani, S., De Luca, F., Priori, E. C., Di Iorio, C., Cobelli, F., Veneroni, P., Bottone, M. G., & Rossi, P. (2020). Squaring the Circle: A New Study of Inward and Outward-Rectifying Potassium Currents in U251 GBM Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 40(5), 813–828. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00776-3>
- Sadjadi, Z., Vesperini, D., Laurent, A. M., Barnefske, L., Terriac, E., Lautenschläger, F., & Rieger, H. (2022). Ameboid cell migration through regular arrays of micropillars under confinement. *Biophysical Journal*, 121(23), 4615–4623. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.10.030>
- Santoro, F., Merlino, F., Brancaccio, D., Camerino, I., Belli, S., Cimmino, A., Grieco, P., Colucci-D'Amato, L., Stoppelli, M. P., Franco, P., & Carotenuto, A. (2025). Glioblastoma Cell Migration, Invasion and Vasculogenic Mimicry Downmodulated by Novel uPAcyclin Derivatives. *Cells*, 14(4), 259. <https://doi.org/10.3390/cells14040259>
- Scognamiglio, A., Corvino, A., Caliendo, G., Fiorino, F., Perissutti, E., Santagada, V., & Severino, B. (2025). Druggability of Sodium Calcium Exchanger (NCX): Challenges and Recent Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(18), 8888. <https://doi.org/10.3390/ijms26188888>
- Senrunga, A., Lalwani, S., Janjua, D., Tripathi, T., Kaur, J., Ghuratia, N., Aggarwal, N., Chhokar, A., Yadav, J., Chaudhary, A., Joshi, U., & Bharti, A. C. (2023). 3D tumor

- spheroids: morphological alterations a yardstick to anti-cancer drug response. *In Vitro Models*, 2(6), 219–248. <https://doi.org/10.1007/s44164-023-00059-8>
- Seymour, T., Nowak, A., & Kakulas, F. (2015). Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00159>
 - Shah, S., Nag, A., Sachithanandam, S. V., & Lucke-Wold, B. (2024). Predictive and Prognostic Significance of Molecular Biomarkers in Glioblastoma. *Biomedicines*, 12(12), 2664. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12122664>
 - Shenoy, G., Kheirabadi, S., Ataie, Z., Sahu, A. P., Palsa, K., Wade, Q., Khunsriraksakul, C., Khristov, V., Slagle-Webb, B., Lathia, J. D., Wang, H., Sheikhi, A., & Connor, J. R. (2023). Iron inhibits glioblastoma cell migration and polarization. *The FASEB Journal*, 37(12). <https://doi.org/10.1096/fj.202202157RR>
 - Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
 - Song, M., Chen, D., & Yu, S. P. (2014). The TRPC channel blocker SKF 96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the Na^+ / Ca^{2+} exchanger and increasing intracellular Ca^{2+} . *British Journal of Pharmacology*, 171(14), 3432–3447. <https://doi.org/10.1111/bph.12691>
 - Sosnoski, D. M., & Gay, C. V. (2008). NCX3 is a major functional isoform of the sodium–calcium exchanger in osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(4), 1101–1110. <https://doi.org/10.1002/jcb.21483>
 - Steponaitis, G., & Tamasauskas, A. (2021). Mesenchymal and Proneural Subtypes of Glioblastoma Disclose Branching Based on GSC Associated Signature. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4964. <https://doi.org/10.3390/ijms22094964>
 - Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
 - Sun, B., Zhang, D., Zhang, S., Zhang, W., Guo, H., & Zhao, X. (2007). Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein

- expression in melanoma. *Cancer Letters*, 249(2), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.08.016>
- Sundelacruz, S., Levin, M., & Kaplan, D. L. (2009). Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(3), 231–246. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9080-2>
 - Torsvik, A., Stieber, D., Enger, P. Ø., Golebiewska, A., Molven, A., Svendsen, A., Westermarck, B., Niclou, S. P., Olsen, T. K., Chekenya Enger, M., & Bjerkvig, R. (2014). U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Medicine*, 3(4), 812–824. <https://doi.org/10.1002/cam4.219>
 - Trepap, X., Chen, Z., & Jacobson, K. (2012). Cell Migration. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2369–2392. <https://doi.org/10.1002/j.2040-4603.2012.tb00467.x>
 - Turner, K. L., Honasoge, A., Robert, S. M., McFerrin, M. M., & Sontheimer, H. (2014). A proinvasive role for the Ca^{2+} -activated K^{+} channel KCa3.1 in malignant glioma. *Glia*, 62(6), 971–981. <https://doi.org/10.1002/glia.22655>
 - Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Hayes, D. N. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
 - Waitkus, M. S., Diplas, B. H., & Yan, H. (2018). Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell*, 34(2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.04.011>
 - Wang, S., Ke, Y., Lu, G., Song, Z., Yu, L., Xiao, S., Sun, X., Jiang, X., Yang, Z., & Hu, C. (2013). Vasculogenic mimicry is a prognostic factor for postoperative survival in patients with glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 112(3), 339–345. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1077-7>
 - Wei, X., Chen, Y., Jiang, X., Peng, M., Liu, Y., Mo, Y., Ren, D., Hua, Y., Yu, B., Zhou, Y., Liao, Q., Wang, H., Xiang, B., Zhou, M., Li, X., Li, G., Li, Y., Xiong, W., & Zeng, Z. (2021). Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Molecular Cancer*, 20(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01288-1>
 - 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>
- Zhang, S., Zhang, D., & Sun, B. (2007). Vasculogenic mimicry: Current status and future prospects. *Cancer Letters*, 254(2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.036>
 - Zhou, Z., Luther, N., Singh, R., Boockvar, J. A., Souweidane, M. M., & Greenfield, J. P. (2017). Glioblastoma spheroids produce infiltrative gliomas in the rat brainstem. *Child's Nervous System*, 33(3), 437–446. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3344-y>
 - Zhuang, P., Chiang, Y.-H., Fernanda, M. S., & He, M. (2024). Using Spheroids as Building Blocks Towards 3D Bioprinting of Tumor Microenvironment. *International Journal of Bioprinting*, 7(4), 444. <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i4.444>
 - Ziegler, W. H., Liddington, R. C., & Critchley, D. R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends in Cell Biology*, 16(9), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.07.004>