

LA CARTILAGINE DI SQUALO

La cartilagine di squalo, motivo di molteplici studi per la sua presunta attività anticancro, recentemente è stata ulteriormente rivalutata per la sua componente proteica in quanto possiede proprietà anti-angiogenetiche. Per una adeguata comprensione dell'importanza della neo-angiogenesi tumorale non si può prescindere da alcune conoscenze di base.

IL PROCESSO DI METASTATIZZAZIONE si riconosce in questi meccanismi:

- 1) modifica del pattern di molecole di adesione sulla superficie cellulare con perdita del contatto
- 2) capacità di degradare la matrice extra cellulare per l'azione di proteasi
- 3) capacità di migrare
- 4) capacità di riconoscere endotelio
- 5) capacità di extravasare
- 6) modifiche del flusso ematico che aggira sistema immunitario
- 7) capacità di colonizzare
- 8) capacità di riacquistare l'interazione cellula-cellula
- 9) capacità di reintegrare l'interazione con la matrice cellulare

La metastatizzazione è un evento caratterizzato dalla migrazione di cellule dalla massa tumorale primaria ad un organo bersaglio.

In questo processo appare ovvia, sebbene non ancora pienamente dimostrata, una potenziale funzione delle molecole di adesione che determinano le interazioni intercellulari.

Nell'ambito della massa tumorale inoltre si determina un alterato rapporto tra velocità di crescita e progressione verso la morte programmata (apoptosi). Nel controllo di entrambi gli eventi crescita ed apoptosi le molecole di adesione giocano un ruolo fondamentale (ad esempio inibizione da contatto,

ossia la capacità di inibire la proliferazione una volta raggiunta la copertura dell'intera superficie libera da parte di cellule proliferanti).

MOLECOLE DI ADESIONE E CANCRO

Queste molecole sono glicoproteine localizzate sulla membrana cellulare responsabile dell'adesione delle cellule tra loro (adesione cellula-cellula) e delle cellule con la matrice extracellulare (adesione cellula-matrice).

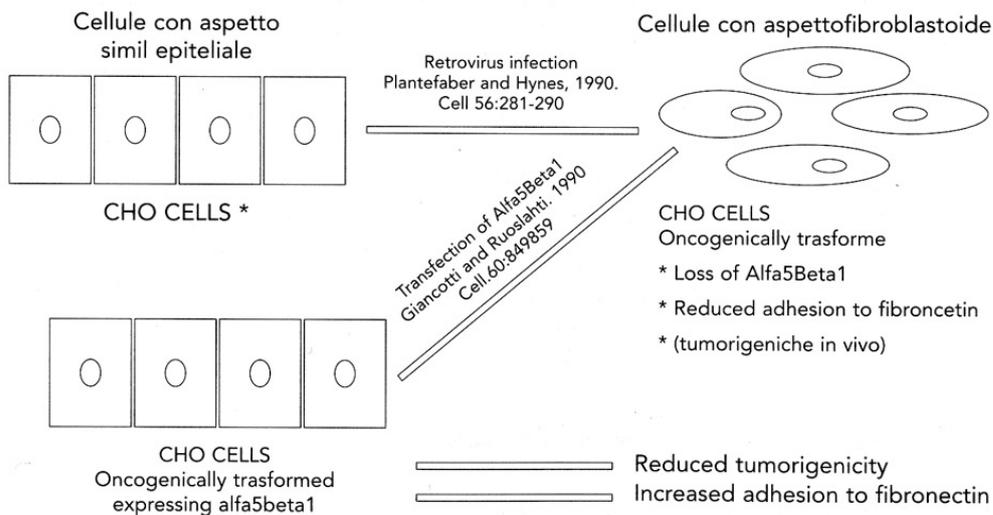
A grandi linee si possono classificare in:

1) **integrine** soprattutto coinvolte nell'interazione tra la cellula e la matrice extracellulare (talvolta, ma in minor misura, anche nell'interazione cellula-cellula). Sono eterodimeri costituiti da una sub-unità di tipo alfa e una di tipo beta. Esistono otto diversi tipi di catene beta e quattordici diversi tipi di catene alfa. Sebbene esistano delle associazioni alfa-beta preferenziali, ossia non tutte le combinazioni sono possibili, si determina una ridondanza dei recettori. Questo fa sì che la stessa sub unità alfa o beta possa legare diverse sub unità eterologhe. Al tempo stesso si determina una ridondanza dei meccanismi di riconoscimento per cui ciascuna molecola della matrice extracellulare può essere riconosciuta da più di una associazione alfa beta. Nel corso della progressione tumorale le integrine possono giocare un ruolo come evidenziato da diversi dati in letteratura.

Esempio:

in vitro: fibroblasti umani trasformati privi di $\alpha_5 \beta_1$ coltivati su matrice di fibronectina sono in grado di migrare, perdono la inibizione da contatto e se iniettati in topo nudo danno luogo a metastasi polmonari (vedi disegno).

Se trasfetto nelle cellule alfa 5 e beta1 le cellule riacquistano un aspetto normale.



* Cellule di ovaio di criceto

in vivo: il melanoma in crescita orizzontale esprime $\alpha_5\beta_1$ come recettore per la fibronectina.

In crescita verticale invece esprime Alfa v e Beta3.

Mentre $\alpha_5\beta_1$ codifica per un segnale di stop alla migrazione cellulare su un substrato di fibronectina alfa v e Beta3 sullo stesso substrato induce migrazione.

A seconda della catena Beta si distinguono diversi gruppi. In particolare:

- Gruppo beta1 integrine o famiglia VLA: hanno funzioni di ancoraggio alla matrice. Legano collagene, laminina e fibronectina. Si trovano sui globuli bianchi e sulle cellule endoteliali (VLA1 - VLA2 - VLA3 - VLA4* - VLA5 - VLA6)

**in concentrazione molto elevata sulla superficie di cellule T monocitarie di origine neoplastica*

- Gruppo della beta2 integrine: è costituito da tre molecole LFA1, MAC1, GP150, 95. Esse sono espresse soltanto sulla serie bianca MAC1, GP150, 95 ed i loro ligandi sono presenti sia sull'endotelio che sull'epitelio. Esse non svolgono funzioni di adesione cellula-matrice.

- Gruppo della beta3 integrine o citoadesine: è costituito dalla glico-proteina IIa/IIIb presente solo sulle piastrine e dal recettore della vitronectina presente sia su endotelio che su epitelio.

2) **Caderine:** sono una famiglia di proteine responsabili dell'adesione intercellulare. Sono calcio-dipendenti.

Nella loro struttura si identificano tre regioni:

- dominio extracitoplasmatico che lega il calcio e consente l'interazione con un'altra caderina
- dominio transmembrana per la trasduzione del segnale
- dominio intracitoplasmatico che lega proteine di cui le più importanti sono le alfa e le beta catenine.

Le caderine possono essere:

- diffuse sulla membrana consentendo alla cellula di attaccarsi senza formare strutture particolari
- aggregate formando strutture quali giunzioni cellulari, desmosomi, ecc.

La beta catenina legandosi alle caderine ne modula la capacità di adesione, ed al tempo stesso è a sua volta soggetto a regolazione da parte delle caderine.

Le vie metaboliche di regolazione dell'attività delle catenine soprattutto della beta coinvolgono, tra l'altro, processi di fosforilazione e defosforilazione sia in serina che in tirosina operate da apposite chinasi e fosfatasi. Lo stato di fosforilazione delle beta catenine determina una maggiore affinità per una proteina chiamata APC (Adenomatous Polyposis Coli) il complesso APC + beta catenina viene

rapidamente ubiquitinato e degradato. In assenza di fosforilazione la beta catenina è in grado attivare la trascrizione di diversi geni coinvolti nella progressione cellulare e nella morte programmata. L'APC è codificata da un gene sul quale mappano gran parte delle mutazioni della poliposi multipla familiare. Sebbene non ci siano ancora evidenze certe e significative del coinvolgimento delle caderine nella progressione tumorale questi dati fanno pensare comunque ad un possibile loro ruolo. Tra l'altro una ridotta attività funzionale di E-caderina correla con un aumentato distacco di cellule tumorali dalla massa primitiva.

Si conoscono diverse caderine. Sembrerebbe che la componente proteica della cartilagine di squalo agisca su alcune di esse, in particolare le VE caderine.

Le VE caderine sono localizzate su cellule endoteliali. Sono caratterizzate da interazione omofila (VE riconosce VE).

L'interazione di cellule endoteliali via VE caderine è modulabile pertanto in alcune situazioni, ad esempio extravasazione di leucociti. La forza d'interazione può ridursi facilitando il passaggio della cellula.

3) **Super famiglia delle Ig** (come molecole di adesione)

Sono glicoproteine che entrano in gioco nell'adesione intercellulare (raramente anche nell'interazione della cellula con la matrice extracellulare). Il primo membro identificato di questa famiglia è stato N CAM, isolato nel 1977 da Brackinburg e Thiery (N CAM da Chick neural retina cells).

Le molecole più studiate sono: ICAM1, ICAM2, VCAM1, PECAM1

ICAM1: su epitelio ed endotelio

ICAM2: su endotelio

VCAM: su endotelio e tessuti linfoidei

PECAM: su piastrine

Le molecole di adesione appartenenti a questa classe (Zg SF) consentono l'interazione fra cellule circolanti e cellule dell'endotelio e consentono il passaggio delle prime attraverso l'endotelio.

1 "rolling") selectine

linfocita (= cellula circolante) 2 rallentamento)

3 stop - I-CAM

ICAM1 ha come recettori Mac1 - LFA1 - integrine

È stato dimostrato che alcuni stimoli (interleuchine, TNF, ecc.) ne aumentano la concentrazione. Questo fenomeno è determinante per la migrazione ed l'adesione di neutrofili e monociti nella la flogosi

ICAM2 ha come recettore LFA1

VCAM	ha come recettore integrino VLA4. Fibronectina, citochine, IFN e TNFalfa ne causano un aumento. Sembra partecipi all'adesione dei linfociti alle cellule endoteliali attivate
PECAM	su piastrin, cellule endoteliali e leucociti. Sembra partecipare all'adesione tra cellule endoteliali

Attualmente non si sa molto circa un possibile ruolo di Ig SF Cams5 nei processi di genesi del tumore e di metastatizzazione, sebbene Brackenburt et al. dimostrarono che vi è una downregulation di NCAM in cellule trasformate con il virus del Sarcoma di Rous e che in alcuni tumori quali alcuni tipi di carcinoma del polmone e nel sarcoma di Ewing si osserva invece in aumento di NCAM.

Inoltre il CEA (antigene carcino-embriionario) che è conosciuto come un marker per alcuni tumori è un membro di questa superfamiglia ed è omologo di NCAM.

Vi sono inoltre delle evidenze che suggeriscono come ICAM e VCAM possano giocare un ruolo assai importante nel processo di metastatizzazione mediando l'attacco di cellule tumorali alla superficie delle cellule endoteliali analogamente a quanto già descritto tra linfocita-endotelio.

4) **Selectine:** sono molecole di adesione inducibili localizzate sulla superficie endoteliale. Sembra che esse siano coinvolte nelle prime fasi del processo di adesione. Sono state identificate P (platelet) E (endothelial) e L (leukocyte) selectine.

Distinguiamo:

ELAM1: glicoproteina espressa solo sulle cellule endoteliali attivate.

Il ligando è rappresentato da una molecola sialil-fucosil pentasaccaridica denominata Sialyl-Le.

ELAM1 favorisce il passaggio di cellule circolanti attraverso gli endoteli e partecipa al reclutamento dei linfociti T e dei monociti

PADGEM: localizzata sia sull'endotelio che sulle piastrine. Interviene nell'aggregazione di piastrine e leucociti all'endotelio

LAM1: su linfociti monociti e granulociti. Responsabile del ritorno dei linfociti negli organi linfatici.

Il ruolo delle selectine nel processo di metastatizzazione è suggerito dal fatto che certe cellule tumorali quali quelle del carcinoma del colon esprimono un fattore sialitato e che l'adesione di queste cellule all'endotelio attivato può essere inibito da anticorpi anti-selectine.

Adesione molecule family	Representative examples	Key characteristics	Representative ligands
Ig Superfamily (=IgSF)	ICAM1, VCAM NCAM, CEA	Disulfide bonded peptide loops related to immunoglobulin molecule	<ul style="list-style-type: none"> Integrins other IgSF members
Integrins	CD11/CD18 family (leucocyte integrins) $\alpha_{v}\beta_3$ vitronectin receptors	Large family of divalent cation-dependent heterodimeric transmembrane glycoproteins	Components of extracellular matrix; IgSF members soluble glycoproteins
Cadherins	E cadherin N cadherin VE cadherin	Calcium dependent single chain glycoprotein	Fucosylated carbohydrate structures (Sialylated Lewis ^x) mucins
Selectins	E selectin P selectin L selectin	Divalent cation-dependent carbohydrate-binding proteins	

Nel 1971 un medico del Children Hospital di Boston ha elaborato una nuova teoria sui tumori. Il suo nome è Judah Folkman, il pioniere degli studi sull'inibizione dell'angiogenesi, oggi considerata una effettiva e valida possibilità per combattere il cancro

Il tumore è un tessuto in continua fase di crescita e per svilupparsi necessita dell'apporto ematico. Inibendo lo sviluppo della rete vasale, che fornisce alle cellule l'ossigeno, le sostanze nutritive e rimuove i cataboliti, il tumore non può crescere e va incontro a necrosi.

La crescita dei tumori solidi non è continua, bensì avviene in due fasi:

- avascolare
- vascolare

Durante la prima fase la massa non supera il diametro di 1-2 mm con una popolazione cellulare di circa 10⁸ cellule. La seconda fase è conseguente solo alla formazione di una nuova rete di capillari che dall'ospite penetrano nella massa. Quindi lo sviluppo della massa tumorale è condizionato dalla fase di neovascolarizzazione. Infatti tumori impiantati in vitro in organi non sviluppano la rete di nuovi capillari, rimangono avascolarizzati e non crescono oltre i 2-3 mm di diametro. Se però vengono reimpiantati in animali ospiti (conigli e topi) si verifica una rapida vascolarizzazione della massa con conseguente crescita.

Quindi si può affermare che i tumori sono angiogenesi-dipendenti, poiché ogni aumento della popolazione cellulare è sempre preceduto dalla comparsa centripeta di nuovi capillari. Questa

affermazione implica ovviamente che la neo-angiogenesi è il fattore di controllo comune alla maggior parte dei tumori solidi.

Secondo un'altra ipotesi sostenuta da Gullino l'espressione dell'attività neo-angiogenetica sarebbe l'evento pre-neoplastico, caratteristica questa comune anche a patologie tumorali benigne. Esistono peraltro anche cellule normali capaci d'indurre neo-angiogenesi quali il macrofago, il linfocita T e l'adipocita e cellule capaci di indurre neo-angiogenesi in tempo determinato quali il corpo luteo, la retina, il testicolo, la cute, le ghiandole salivari ed il rene. Vi sono poi cellule che potrebbero amplificare l'effetto neo-angiogenetico nei tumori quali le mastcellule le quali migrano a delimitare la massa tumorale inoculata. Questo avverrebbe per il rilascio da parte delle cellule neoplastiche di una sostanza chemiotattica per la mastcellule.

Il metodo messo a punto da Folkman per studiare la neo-angiogenesi in vitro è denominato CAM, è universalmente riconosciuto e si basa sull'uso della membrana corioallantoidea di embrioni di pollo. Gli studi in vivo vengono fatti mediante impianti di cellule tumorali nella cornea del coniglio. Questi metodi di studio hanno permesso di rilevare che la crescita di nuovi capillari implica un'ordinata sequenza di eventi:

- la lisi della membrana basale delle venule
- la migrazione delle cellule endoteliali regionali a seguito di uno stimolo angiogenetico
- la creazione del lume vasale
- lo sviluppo di branchie
- l'anastomosi.

Sono proprio le stesse cellule tumorali a fornire lo stimolo neo-angiogenetico.

Folkman ha dimostrato che gli estratti di tumore avevano effetto mitogeno su cellule endoteliali in vitro e in alcuni modelli animali. Questi estratti furono chiamati TAF (Tumour Angiogenesis Factor).

Successivamente furono identificati a livello molecolare diversi fattori proangiogenetici presenti negli estratti di tumore, ad esempio l'angiogenina, l'FGF e l'ECSAF (Endotelial Cell Stimulating Angiogenesis Factor).

Poiché la fase avascolare della crescita dei tumori ha una durata massima di 5 giorni, inibendo i fattori pro-angiogenetici TAF si prolunga la durata di questa fase e si inibisce per contro la proliferazione delle cellule endoteliali indotta dal tumore stesso con conseguente blocco della crescita neoplastica.

Tra i fattori antiangiogenetici già noti, ovvero TGF β , α IFN, protamina, idrocortisone, eparina, retinoidi, metotrexate, minociclina, TNF α , mitoxantrone, pencillamina, cartilagine, Folkman per i suoi studi di inibizione della neo-angiogenesi ha utilizzato un estratto di cartilagine, impiantato nella cornea del coniglio.

Si è osservata una notevole riduzione della velocità di crescita dei capillari, inoltre il 28% dei tumori trapiantati non intraprendeva la fase vascolare con conseguente blocco della crescita neoplastica e successiva necrosi. È stato anche osservato che se l'estratto di cartilagine veniva trattato col calore, la vascolarizzazione della massa avveniva regolarmente, è risultato quindi evidente che il calore denatura i fattori antiangiogenetici.

Questi studi hanno anche rilevato l'assenza di tossicità della cartilagine, al contrario degli altri fattori antiangiogenetici, il cui uso è purtroppo limitato da seri effetti collaterali.

Da quel momento le ricerche sono state indirizzate all'isolamento dei fattori antiangiogenetici (FAG), col fine di mettere a punto una terapia contro il cancro fino ad arrivare ai nostri giorni con l'isolamento

di due fattori rispettivamente denominati angiostatina, frammento proteolitico del plasminogeno, ed endostatina, frammento proteolitico del collagene VIII.

Nel 1983 il Dr Robert Langer, ingegnere chimico dell'equipe di Folkman, ha pubblicato i risultati di un lavoro fatto con la cartilagine di squalo, dal titolo: "Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis", in cui si dimostra che la cartilagine di squalo svolge un'attività antiangiogenetica mille volte superiore rispetto alla cartilagine bovina. Responsabile dell'attività antiangiogenetica è la frazione proteica.

Questo dava la spiegazione del perché gli squali si ammalano molto raramente di cancro.

Dalla cartilagine di squalo è stata isolata una frazione antiangiogenetica presente nella fascia proteica con peso molecolare tra 10^3 e 10^4 , stabile al calore e con struttura simile alla guanidina-HCl, la cui attività è stata sperimentata e convalidata col metodo CAM.

Sembra quindi che l'antiangiogenesi sia provocata da una frazione macroproteica, cioè ad elevato peso molecolare, la quale si lega a siti sub-recettoriali specifici di membrana in presenza di GTP, CAMP e ioni Ca^{2+} . Il segnale viene quindi trasmesso al DNA del nucleo, il quale interviene bloccando le mitosi cellulari delle cellule endoteliali. Inoltre essendo la neo-angiogenesi un fatto essenziale per la metastatizzazione delle cellule tumorali, la sua inibizione oltre che bloccare la crescita neoplastica, può prevenire la diffusione delle metastasi.

La cartilagine di squalo è un mezzo naturale, privo di effetti tossici e secondari, in grado di inibire la neo-angiogenesi.

Si preferisce la cartilagine di squalo a quella bovina per dei precisi motivi:

la cartilagine che si ricava dagli squali è quantitativamente notevole rispetto alla bovina, presenta scarso tessuto adiposo, ha un indice superiore allo standard universale e l'effetto antiangiogenetico è mille volte superiore alla cartilagine bovina.

È stato calcolato che l'incidenza del cancro negli squali è di 1.000.000, quindi veramente irrisoria rispetto agli altri mammiferi, ed è proprio lo scheletro cartilagineo il motivo di questa immunità, oltre che la presenza di un sistema immunitario altamente efficiente.

Basta considerare che le imponenti ferite che spesso gli squali si procurano, guariscono celermente e senza andare incontro ad infezioni.

Lo scheletro dello squalo è composto unicamente da cartilagine, la quale occupa il 7% della massa corporea. La cartilagine si differenzia dal tessuto osseo per la totale assenza di canali in cui scorrono i vasi sanguigni. Essa è quindi avascolarizzata e l'ossigeno e le sostanze nutritive le vengono fornite direttamente dall'acqua. La formazione di vasi sanguigni non avviene per la presenza dei fattori inibitori della neo-angiogenesi, contenuti nella frazione proteica che costituisce il 39% della cartilagine essiccata; per il resto si ritrova un 12% di carboidrati complessi (mucopolisaccaridi), 7% di acqua, 0,3% di grassi, 41% di sali di calcio e di fosforo.

I più autorevoli studi sulla cartilagine di squalo sono stati fatti presso l'Institute Jules Bordet di Bruxelles, uno dei più prestigiosi centri di ricerca sul cancro. La somministrazione orale di cartilagine di squalo a ceppi di topi privi di sistema immunitario e trapiantati con cellule di melanoma umano, inibisce lo sviluppo del cancro, mentre nei gruppi di controllo la massa cresce velocemente e dopo 21 giorni dall'impianto raggiunge dimensioni 2,5 volte superiori rispetto alla massa originale. I topi trattati non sviluppano la neoplasia nel 60% dei casi. Inoltre la somministrazione forzata per via orale di grosse quantità di cartilagine non provoca tossicità alcuna.

La cartilagine di squalo ha un effetto benefico oltre che sul cancro anche nel controllo delle malattie con componente neo-angiogenetica quali la retinopatia proliferativa, l'artrite reumatoide, il glaucoma vascolare, l'angiofibroma, le malformazioni artero-venose, la neovascolarizzazione corneale, la retinopatia diabetica, i granulomi, gli emangiomi, la sindrome di Osler-Weber, tant'è che nel 1991 la FDA americana ha autorizzato l'uso della cartilagine di squalo come supplemento integratore dell'inibizione della neo-angiogenesi. Molto importante è la qualità del principio attivo che si assume. Deve essere il più puro possibile e a tal fine è di primaria importanza il metodo di preparazione usato per la fase di essiccamento e di polverizzazione. Occorre infatti l'applicazione di una metodica che non provochi in particolare la denaturazione delle proteine e quindi della frazione antiangiogenetica, le quali vengono denaturate dai solventi acidi e dall'acetone, normalmente usati per eliminare il grasso, e dal calore oltre i 45° C. La preparazione deve quindi essere fatta a freddo senza l'uso di solventi chimici, sbiancanti, raggi UV e ossido di etilene.

Molto importante è anche la fase della polverizzazione. Le particelle devono essere molto piccole per poter essere assorbite il più celermente possibile attraverso la parete intestinale, prima di subire l'attacco degli enzimi proteolitici. Infatti se ne consiglia sempre l'assunzione almeno mezz'ora prima dei pasti. Sembra, tra l'altro, che l'azione antiangiogenetica della frazione proteica sia supportata e correlata alla presenza dei mucopolisaccaridi e che quindi i due tipi di molecole siano interdipendenti le une dalle altre.

Proprio per le sue capacità di inibire la neo-angiogenesi la cartilagine di squalo viene sconsigliata ai bambini, ai cardiopatici, alle donne in gravidanza o che allattano.