

Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

Ciclo XX

Relazione 3° anno

STUDIO DEI PROFILI DI ADESIONE E PROLIFERAZIONE DI
CELLULE DI NEUROBLASTOMA SK-N-BE SU BIOVETRI
DOPATI CON ZINCO.

Candidato: Valentina Piffanelli

Tutor: Prof. Mario Cannas

INTRODUZIONE

CELLULE SK-N-BE

Le SK-N-BE sono cellule di neuroblastoma e sono state isolate nel Novembre 1972 da una biopsia di midollo osseo di un bambino con neuroblastoma dopo ripetute sedute di chemio e radioterapia.

Il neuroblastoma (NBL) è un tumore solido maligno che origina nei tessuti nervosi del collo, del torace, dell'addome o della pelvi, anche se solitamente insorge nella cavità addominale nei tessuti della ghiandola surrenale. Sebbene sia molto raro, il neuroblastoma rappresenta tuttavia il tumore solido più frequente nei soggetti d'età inferiore ai cinque anni. Il NBL, infatti, costituisce il 7-10% di tutti i tumori solidi osservati in età pediatrica e presenta un'incidenza pari a circa 6.5-10.5 nuovi casi/anno/1.000.000 di soggetti d'età inferiore ai 15 anni, in Italia pari a 30 nuovi casi/anno. Il 93% dei NBL è diagnosticato prima dei 6 anni ed un terzo prima dell'anno di età. I casi diventano molto più rari nelle età successive e la diagnosi è eccezionale nell'adolescente e nell'adulto (1).

Le cellule di neuroblastoma SK-N-BE presentano una morfologia variegata; alcune hanno lunghi processi altre sono di aspetto epiteliale. Inoltre possono formare aggregati e propagarsi in sospensione.

Come noto da letteratura, il trattamento di cellule di neuroblastoma con acido retinoico (Vitamina A) determina il loro differenziamento verso il fenotipo neuronale: le cellule cambiano morfologia con arborizzazione dendritica e formazione di sinapsi con cellule distanti, modificano l'espressione genica con aumento dell'espressione di geni neuronali, proteine neuronali, neurotrasmettitori e mutano la loro attività biochimica (2). Le cellule

SK-N-BE inoltre non presentano un'espressione matura delle integrine di membrana, proteine essenziali per l'adesione cellulare, maggiormente espresse invece nella forma cellulare differenziata (3).

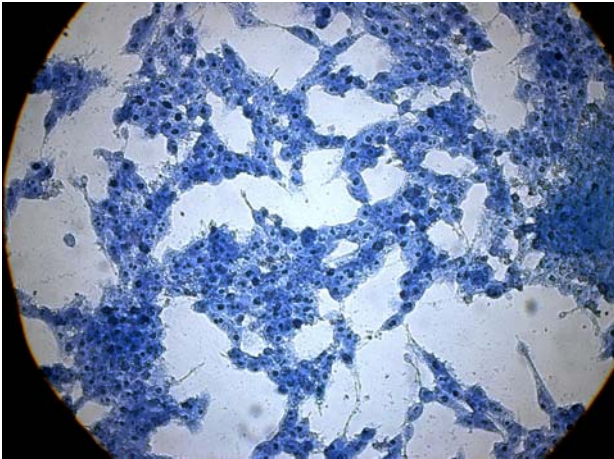


Fig.1- SK-N-BE.

Ingrandimento 40X, colorazione blu di toluidina

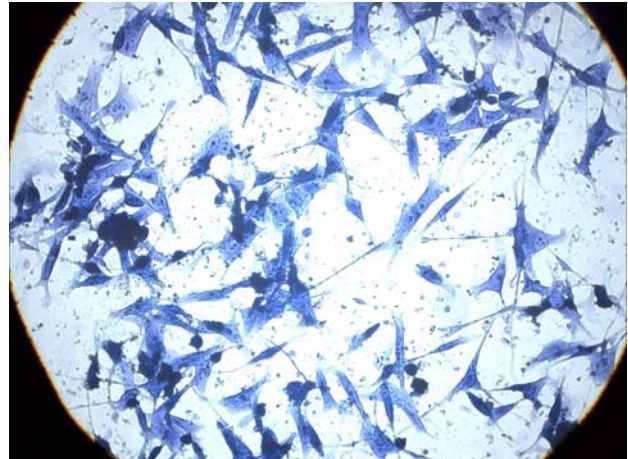


Fig.2- SK-N-BE + R.A.

Ingrandimento 40X, colorazione blu di toluidina

Struttura e funzione delle integrine

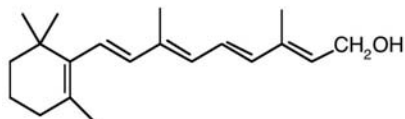
In condizioni normali la sopravvivenza cellulare è la conseguenza di un complesso equilibrio tra cellule e matrice extracellulare e tra cellula e cellula. In particolare, l'interazione tra le cellule e le proteine della matrice extracellulare è essenziale per la regolazione genica, la differenziazione ed il controllo della crescita cellulare (3).

La perdita della capacità di adesione, come pure l'induzione di una eccessiva adesività sono la causa di diverse patologie. Numerosi studi hanno portato ad identificare alcune proteine transmembrana come responsabili dell'adesione. Queste proteine sono state

classificate in diversi gruppi, sulla base di criteri strutturali e funzionali: integrine, caderine, selectine e membri della superfamiglia delle immunoglobuline.

La famiglia delle integrine è costituita da eterodimeri formati da subunità α e β (da 95.000 a 200.000 dalton), unite da legami non covalenti. La specificità di legame per ogni ligando sembra dipendere dal dominio extracellulare della subunità α . La subunità β è comunque indispensabile per la funzionalità dell'integrina, e presenta ripetizioni tandem di quattro regioni ricche di residui di cisteina, che sono considerate essenziali per il mantenimento della struttura tridimensionale della molecola. Le integrine interagiscono con il citoscheletro allo scopo di legare le cellule alla matrice; infatti il legame transmembrana al citoscheletro sembra essere un requisito fondamentale sia per i fenomeni di adesione delle cellule alla matrice, sia per quelli di adesione tra le cellule stesse. La connessione con il citoscheletro può attivare l'integrina, cambiare la sua conformazione, aumentare la capacità di legame per il suo specifico ligando. Esse permettono alle cellule normali di avere la percezione di essere adese alla matrice extracellulare, fornendo quindi un segnale di sopravvivenza, la cui mancanza comporta la perdita del controllo del meccanismo di crescita cellulare. La mancata interazione fra integrine e matrice comporta l'attivazione di complesse vie metaboliche (ad es. cooperazione fra integrine e diverse classi di proteasi), le quali portano ad una aumentata sopravvivenza e motilità delle cellule tumorali.

ACIDO RETINOICO



L'acido retinoico (RA) e in generale i retinoidi sono molecole segnale che, insieme ai loro recettori nucleari, stabiliscono dei networks di comunicazione genetica essenziali per lo sviluppo embrionale e per il mantenimento dello stato differenziato dei tessuti attraverso la regolazione della proliferazione, differenziamento e morte cellulare (4-5). Di particolare importanza è il ruolo esercitato sullo sviluppo e sulle funzioni fisiologiche del sistema nervoso e del sistema riproduttivo (6). I retinoidi, grazie al loro potere di condurre al differenziamento cellulare, offrono grandi potenzialità nella terapia del cancro.

L'Acido retinoico è un derivato della vitamina A e la sua principale funzione è quella di essere un "master regulator" dell'espressione genica. Solo una piccola porzione (0.2-5%) del retinolo presente nel plasma o nei tessuti viene convertita in acido retinoico all-trans (ATRA), il principale attivatore dei recettori per l'acido retinoico. Altri metaboliti con funzione di molecola segnale sono l'acido 9-cis RA e 13-cis RA. L'Acido Retinoico agisce mediante due tipi di recettori nucleari appartenenti alla famiglia dei recettori degli ormoni steroidei: RAR (Retinoic Acid Receptor) e RXR (Retinoic Receptor) (7-8). I recettori RAR, detti α , β e γ , funzionano da regolatori trascrizionali, una volta accesi regolano complessi proteici coattivatori che, legandosi al DNA, inducono la derepressione della cromatina e la successiva espressione dei geni RA-responsivi (9-10-11).

I RAR e gli RXR sono fattori di trascrizione che funzionano principalmente come RAR-RXR eterodimeri. Questi eterodimeri presentano due funzioni distinte: la prima è quella di modulare la trascrizione di geni target in seguito a binding con i RARE (Retinoic Acid Response Element) presenti nei promoters di tali geni, la seconda consiste nel modificare l'efficienza di altri pathways attraverso meccanismi non ancora del tutto chiari. L'effetto di questo tipo più importante è senz'altro la repressione dell'attivazione trascrizionale mediata da AP-1. E' infatti anche grazie a questa inibizione che si può spiegare l'effetto anti-oncogenico dell'acido retinoico.

A livello molecolare l'Acido Retinoico è lipofilico e quindi diffonde facilmente attraverso la membrana cellulare; esso si lega e attiva gli RARs che inducono l'espressione di geni quali gli "Rho GTPase family genes", coinvolti nella dinamica del citoscheletro, nello sviluppo, elongazione e guida dell'assone (Fig.3).

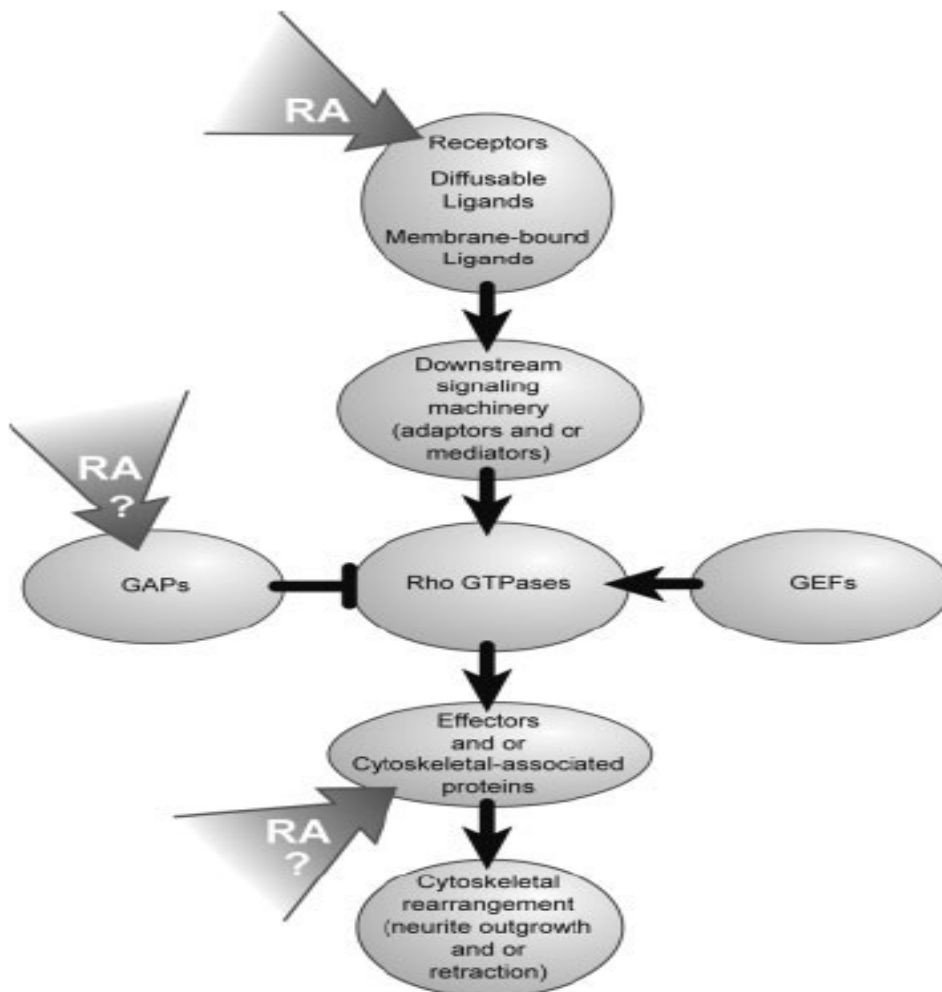


Fig.3

I neuriti si formano grazie a cambiamenti che coinvolgono il citoscheletro actinico e il network di microtubuli; si creano strutture quali lammellipodia, filopodia e il cono di crescita e la cellula (neurone) si differenzia mostrando un assone e i dendriti (Fig4- Fig.5). Da letteratura è noto che il massimo differenziamento neuronale si ottiene entro 20 giorni dall'inizio del trattamento delle cellule di neuroblastoma con Acido Retinoico.

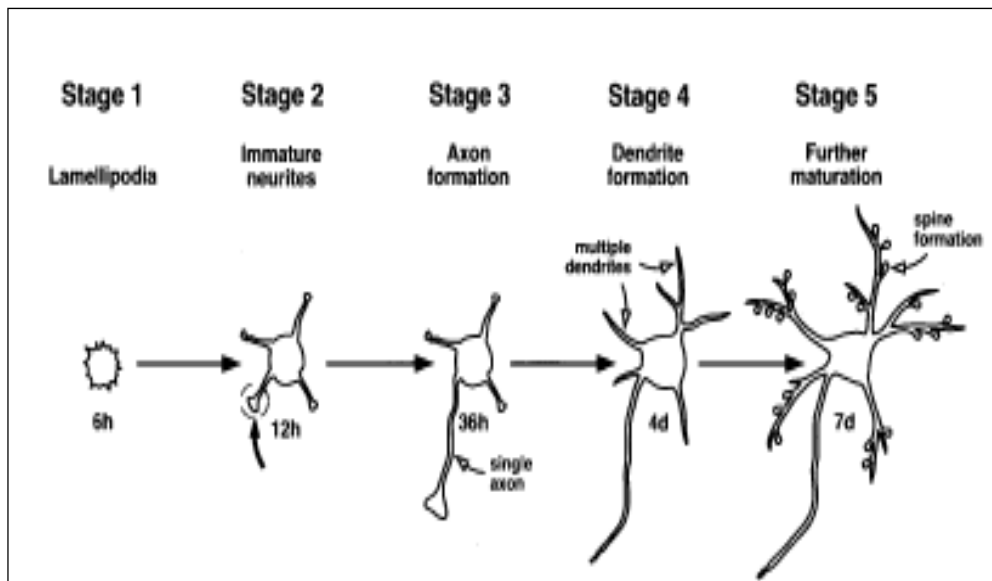


Fig.4

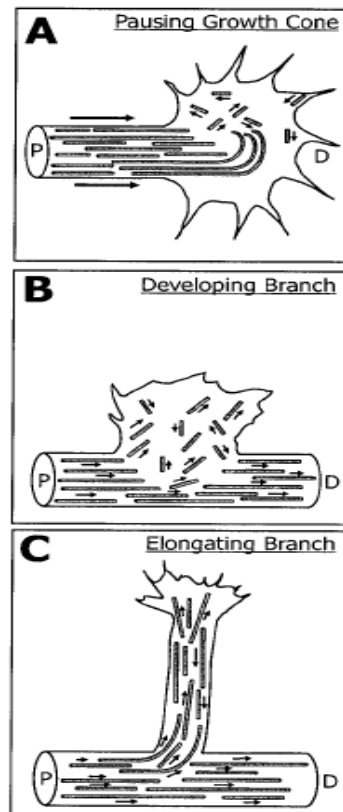


Fig.5

BIOMATERIALI

Oggi sono disponibili materiali che vengono utilizzati in applicazioni dentali ed ortopediche come sostituenti del tessuto osseo o come rivestimento di impianti metallici (12), in grado di facilitare l'adesione e la duplicazione cellulare e la formazione di matrice sulla superficie degli impianti stessi (13). Un esempio sono i Bioglass®, che sono stati classificati come materiali bioattivi (o biomateriali).

Il concetto di vetro bioattivo fu introdotto per la prima volta nel 1971 con la sintesi del Bioglass 45S5 da parte di L.L.Hench: questo materiale è composto da SiO_2 , CaO , P_2O_5 e Na_2O (14). Da allora sono stati ampiamente studiati per applicazioni cliniche molti altri materiali e vetri ceramici con composizione chimica simile (15). Il recente avvento di tecniche di sintesi "sol-gel" ha permesso un maggior controllo delle strutture, delle superfici e della composizione dei vetri stessi, portandoli così a poter essere utilizzati per applicazioni più specifiche.

Per esempio, è stata proposta la parziale sostituzione del sodio con zinco nei vetri bioattivi per stimolare la proliferazione e la differenziazione cellulare (16); lo zinco infatti è un elemento fondamentale per la crescita, la proliferazione ed il differenziamento cellulare, sebbene i meccanismi biochimici in cui è coinvolto non siano ancora del tutto chiari (17). Lo zinco è un cofattore per molti enzimi, stimola la sintesi proteica ed è un metallo fondamentale per la replicazione del DNA (18); inoltre dal punto di vista strettamente chimico prolunga la durezza dei materiali ritardandone la dissoluzione e le reazioni in ambiente acquoso (come nei liquidi biologici) ed incrementa le proprietà meccaniche dei materiali stessi (19).

Per tutti questi motivi sono stati recentemente sintetizzati dei nuovi materiali bioattivi chiamati "HZ", dalla composizione chimica simile a quella del materiale 45S5 di Hench, ma con, in più, quantità differenti di zinco sottoforma di ZnO (20). In particolare questi

biovetri contengono il 5%, 10% e 20% w/w di zinco nella loro composizione chimica rispetto al Bioglass 45S5 (Tab.1).

	ZnO (%w/w)	SiO ₂ (%w/w)	Na ₂ O (%w/w)	CaO (%w/w)	P ₂ O ₅ (%w/w)
45S5 (H)	-	44.75	24.43	24.50	5.93
HZ5	4.94	42.54	23.27	23.40	5.64
HZ10	10.05	40.44	22.08	22.02	5.39
HZ20	20.13	37.14	18.75	18.86	4.64

Tab.1- Composizione chimica dei diversi materiali

Lo zinco addizionato ai materiali di Hench è in forma ZnO; è noto che lo ione Zn²⁺ presenta due comuni geometrie di coordinazione nelle specie ossigenate, tetraedrica ed ottaedrica. Da recenti studi condotti su questi materiali si è evinto che si ha una diminuzione della concentrazione di zinco in forma tetraedrica a vantaggio di quella ottaedrica in relazione ad un aumento dello zinco totale aggiunto al materiale di Hench iniziale. La struttura cristallina di questi materiali presenta Forze di Van der Waals che coinvolgono gli ioni sodio, calcio ed ossigeno; i cationi alcalini ed alcalino-terrosi risultano essere legati agli atomi di ossigeno allo stato fondamentale. In queste strutture si osserva inoltre un raggruppamento di ioni sodio attorno allo zinco, che provvedono, in una certa misura, alla compensazione per la mancanza di cariche positive. Lo zinco svolge quindi uno specifico ruolo strutturale conferendo ai materiali caratteristiche di impaccamento sempre più consistenti a seconda della concentrazione dello zinco stesso aggiunto (19). Inoltre questi modelli atomici hanno mostrato che lo zinco, essendo molto impaccato nella rete strutturale dei materiali, non viene rilasciato in soluzione, dopo tempi di ammollo variabili ma utili per esperimenti di adesione e proliferazione cellulare

(20-21). Il dato varia su tempi molto più lunghi ed in funzione della concentrazione di zinco nel materiale.

Questi materiali sono stati studiati già in precedenza come substrati per l'adesione cellulare ed i risultati ottenuti hanno dimostrato che un'alta concentrazione di zinco (HZ20) sia in grado di modificare le caratteristiche chimico-fisiche di superficie dei materiali riducendo così le possibilità adesive delle cellule. Questo dato è stato confermato dall'assenza di contatti focali osservata sulle cellule piastrate su vetri HZ10 e HZ20 (21).

SCOPO DEL LAVORO

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la capacità adesiva e proliferativa delle cellule di linea di neuroblastoma SKNBE e di quelle differenziate con Acido Retinoico (R.A.) a contatto con vetri bioattivi di Hench. Sono stati utilizzati sia i materiali privi di zinco (H) sia i materiali contenenti diverse concentrazioni di zinco (HZ5, HZ10 e HZ20) al fine di determinare un'eventuale relazione tra l'indice di adesione e crescita cellulare ed il contenuto di zinco nei materiali stessi.

Le cellule SKNBE differenziate con Acido Retinoico presentano un'espressione matura di Integrine rispetto alle stesse cellule non differenziate; scopo di questo lavoro è stato pertanto anche quello di verificare quest'espressione sia responsabile di un differente comportamento delle due tipologie cellulari a contatto con i materiali studiati.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI E MATERIALI DI HENCH

Le cellule di linea di neuroblastoma SKNBE sono state coltivate con terreno di coltura "Dulbecco modified Eagle's medium" (DMEM) supplementato con il 10% di siero fetale bovino, antibiotici (5% streptomina, glutammina e penicillina) e mantenute a 37°C e al 5% di CO₂.

Queste cellule sono state successivamente trattate con all-trans-retinoic acid (RA, Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA) 10 μ M fino ad un massimo di 20 giorni, con periodica sostituzione del mezzo ed aggiunta di acido retinoico.

I materiali di Hench da noi utilizzati sono stati preventivamente misurati con il programma Leica Qwin, al fine di seminare un'esatta quantità di cellule sulla superficie di

ogni materiale, e successivamente sterilizzati; in particolare, in questo lavoro, sono state piastrate 40.000 cell/cm² per gli esperimenti di adesione cellulare e 20.000 cell/cm² per quelli di proliferazione. Le cellule trattate con acido retinoico utilizzate in questo lavoro sono state differenziate per 10 giorni; questo perché è stato riscontrato, dopo tale tempo, un livello di differenziamento e di integrità cellulare ottimale per questo genere di esperimento.

Le cellule SKNBE e SKNBE+RA sono state seminate a goccia e lasciate a contatto con i materiali per diversi intervalli di tempo: 1, 3, 6 e 12 ore per gli esperimenti di adesione su superficie, 24, 48 e 72 ore per quelli di proliferazione, con adeguata aggiunta di terreno di coltura dopo le prime ore di incubazione. Questi intervalli di tempo sono stati scelti in base a precedenti lavori di adesione e proliferazione condotti su plastica, utilizzata poi in questo ambito come controllo.

Ogni esperimento è stato prodotto in triplicato al fine di valutare: la vitalità cellulare delle cellule sui materiali (MTT test), la morfologia delle stesse cellule (Arancio di Acridina) e l'espressione di marker neuronali (Western Blot).

MTT TEST

La vitalità cellulare è stata misurata con il test del MTT, un metodo di valutazione dell'attività mitocondriale; sono stati aggiunti 100 µl/ml di soluzione madre di MTT (5mg/ml in PBS) direttamente nel terreno di coltura a contatto con i materiali, per due ore a 37°C. Successivamente è stato asportato il terreno e sono stati lentamente aggiunti 100 µl di DMSO direttamente sui materiali seminati. Il DMSO è in grado di sciogliere i sali di formazano che si formano, in corrispondenza delle cellule, in seguito all'aggiunta di MTT e si colora di color porpora-viola a seconda della vitalità cellulare. Più le cellule sono vitali più il DMSO appare colorato. Successivamente è stata fatta una lettura spettrofotometrica a 590 nm dei campioni ottenuti ed i risultati sono stati

espressi in grafici. La media dei diversi parametri è stata calcolata come media \pm Errore Standard della Media; si sono fatte analisi statistiche della varianza (ANOVA) con livello di significatività posto pari a $p < 0.05$.

ARANCIO DI ACRIDINA

Ai tempi prestabiliti le cellule sono state fissate ai materiali dopo asportazione del terreno di coltura e due lavaggi in PBS. La fissazione è avvenuta a caldo in stufa, mettendo i materiali a 60°C per 20 minuti.

Successivamente è stata fatta una colorazione con Arancio di Acridina (soluzione al 0,025% in PBS) e le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza con filtro viola.

WESTERN BLOT

Per valutare, tramite western blot, l'espressione di proteine tipiche neuronali, dopo 24 ore di adesione ai materiali, le cellule seminate (40.000 cell/cm²) sono state lisate con SDS bollente a 95°C. Contemporaneamente è stato fatto il lisato anche sul pellet ottenuto dalla precipitazione delle cellule rimaste nel terreno di coltura, al fine di valutare se processi apoptotici fossero coinvolti nella morte delle stesse cellule. In entrambi i casi, il contenuto proteico totale è stato stimato con la tecnica BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). Gli esperimenti di Western Blot sono tuttora in corso; in particolare fino ad ora sono stati fatti esperimenti per valutare l'espressione di β III tubulina (Rabbit monoclonal antibody, Covance, Berkeley, California), del Neurofilamento (NF-L (N-14), Goat polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, INC) e di GAP-43 (GAP-43 (H-100) rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, INC) sia nelle cellule SKNBE sia nelle SKNBE+RA adese alla plastica di controllo.

Sono stati caricati 10 µg di proteine di ciascun campione per la corsa elettroforetica su un gel doppio al 10% di SDS in poliacrilamide. Il gel è stato poi trasferito su membrana in nitrocellulosa per un'ora. Le membrane sono state poi trattate con buffer Tris-Tween (pH 7.6) al 5% di siero bovino per un'ora e successivamente incubate overnight con gli anticorpi I precedentemente elencati. Tali anticorpi sono stati rilevati con substrati chemiluminescenti (ECL, Amersham International, Little Chalfont, U.K.) coniugati con perossidasi di rafano anti rabbit/goat (Sigma, St. Luis, MI, U.S.A.).

Sono tuttora in corso esperimenti per valutare l'espressione di queste proteine su entrambe le tipologie cellulari a contatto con i diversi materiali.

Western blot sono stati eseguiti anche per valutare la presenza o meno di marker apoptotici, quali le caspasi-8 attivata (mouse monoclonal antibody, clone Asp-384; Calbiochem, La Jolla, CA, U.S.A.), la caspasi-9 attivata (rabbit polyclonal, clone Ab-2; Oncogene, San Diego, CA, USA), e la caspasi-3 (rabbit policlonal antibody, clone Asp-175; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, U.S.A), sui lisati ottenuti dalle cellule staccate dai materiali presenti nel terreno di coltura.

RISULTATI

CELLULE SK-N-BE

Per quanto riguarda le cellule di linea SK-N-BE i risultati che abbiamo ottenuto sono stati espressi con i grafici riportati di seguito (Fig.6-Fig.7).

Come si può osservare dai dati ottenuti dalla lettura spettrofotometrica del test del MTT, le cellule SK-N-BE risultano aderire ai materiali in modo significativo già dopo un'ora di incubazione, sebbene quelle adese al materiale di Hench siano statisticamente inferiori rispetto a quelle adese altri materiali dopati con zinco. Dopo tre ore di incubazione si ha una diminuzione percentuale di cellule in adesione ai materiali sempre più evidente a mano a mano che aumenta la concentrazione di zinco aggiunto al materiale di riferimento (H); la diminuzione di cellule adese tra una e tre ore risulta invece molto poco evidente su H stesso. Statisticamente significativa è invece la diminuzione delle cellule su tutti i materiali dopo sei ore di incubazione. Dopo 12 ore, ultimo intervallo di tempo da noi valutato per i profili di adesione, si osserva una notevole ripresa di questa su tutti i campioni considerati, con valori compresi fra 70-80% di SK-N-BE presenti rispetto alle cellule inizialmente seminate sui materiali (Fig.6).

Per quanto riguarda i profili proliferativi (Fig.7), si è potuto osservare che a 48 ore si ha un aumento di cellule adese sia su H sia su HZ5 rispetto alle 24 ore, sebbene la percentuale, in entrambi i casi, sia inferiore rispetto alla percentuale di SK-N-BE riscontrata a 12 ore; dato questo che poi diminuisce a 72 ore su entrambi i materiali, anche se in modo non particolarmente evidente. Risultati differenti sono stati ottenuti invece su HZ10 e HZ20; HZ10 ha presentato infatti una percentuale di cellule in proliferazione praticamente equivalente sia dopo 24 sia dopo 48 ore, per poi avere un minimo aumento dopo 72 ore di incubazione (andamento comunque significativamente inferiore rispetto a H e a HZ5). In HZ20 è stata invece osservata una diminuzione progressiva della percentuale di cellule in proliferazione sul materiale passando da 24, 48

e 72 ore. I valori corrispondenti a tali tempi inoltre si sono dimostrati essere significativamente inferiori sia a quelli riscontrati sui materiali con concentrazione di zinco minore (HZ5 e HZ10), sia a H.

Su tutti i materiali e a tutti gli intervalli di tempo considerati sono state fatte colorazioni con Arancio di Acridina, al fine di valutare la morfologia delle cellule seminate e verificare un'eventuale alterazione strutturale delle stesse al passare del tempo.

Le SK-N-BE sono cellule che tendono a formare piccoli aggregati fra di loro, aderiscono e proliferano quasi sempre utilizzando solo una parte del substrato su cui sono disposte; inoltre i materiali da noi utilizzati non presentano una superficie liscia, ma ricca di irregolarità. Tali caratteristiche hanno spesso reso difficoltosa l'acquisizione di immagini al microscopio.

I risultati ottenuti sono presentati in Fig.8, dove vengono riportate per semplicità solamente le immagini delle cellule adese a tutti i materiali dopo 1 ora e dopo 72 ore di incubazione. Come si può osservare la morfologia cellulare non varia in modo significativo nel tempo e nemmeno a seconda del materiale su cui le cellule vengono seminate; si può notare però una variazione della densità cellulare sui diversi substrati rispetto alla plastica di controllo (CTR).

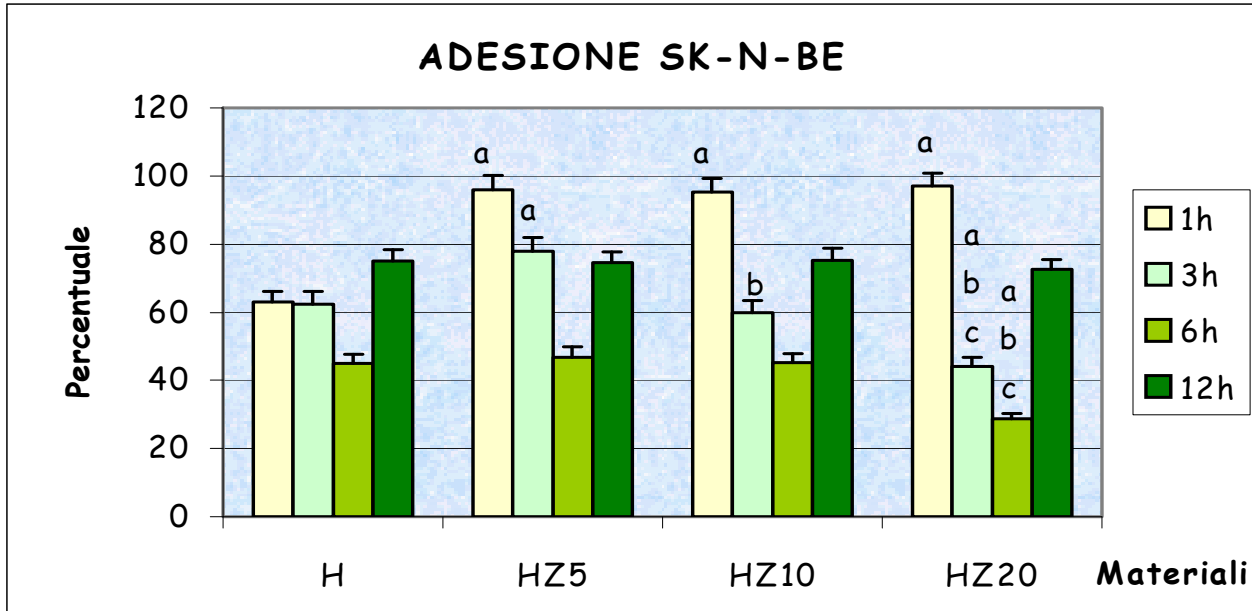


Fig.6 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE in adesione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione.
 Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

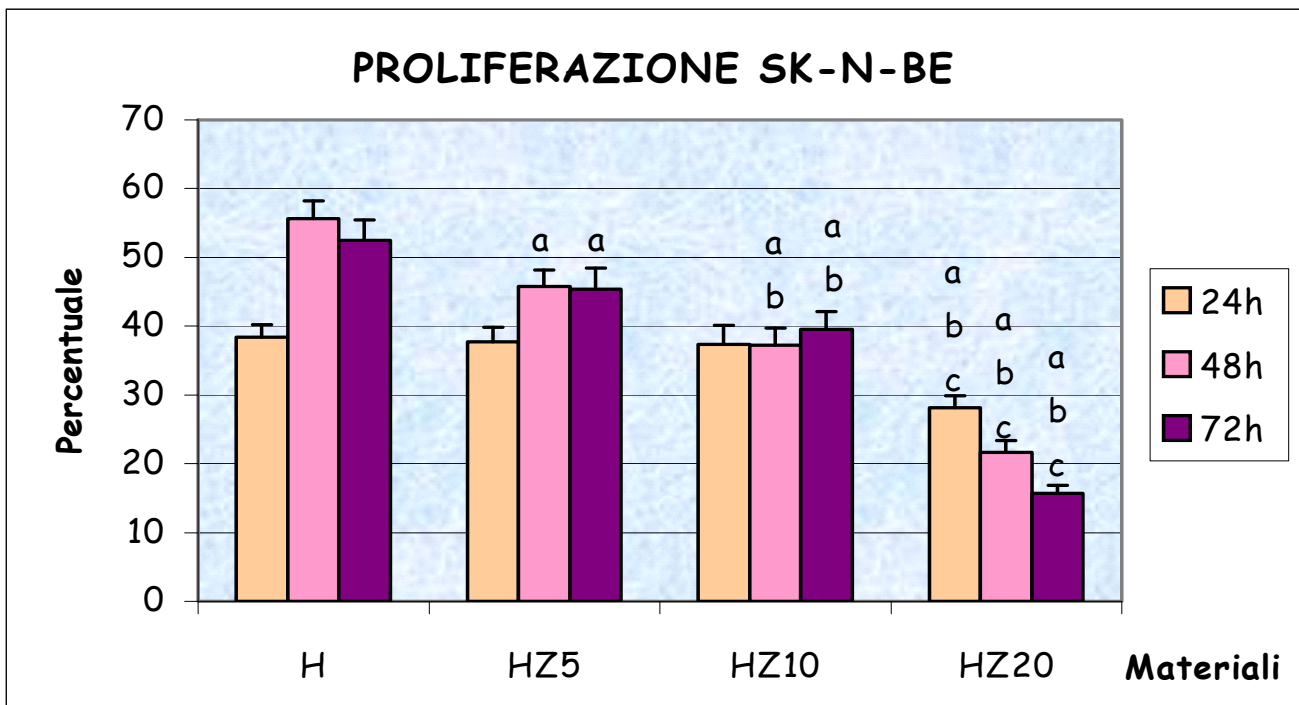
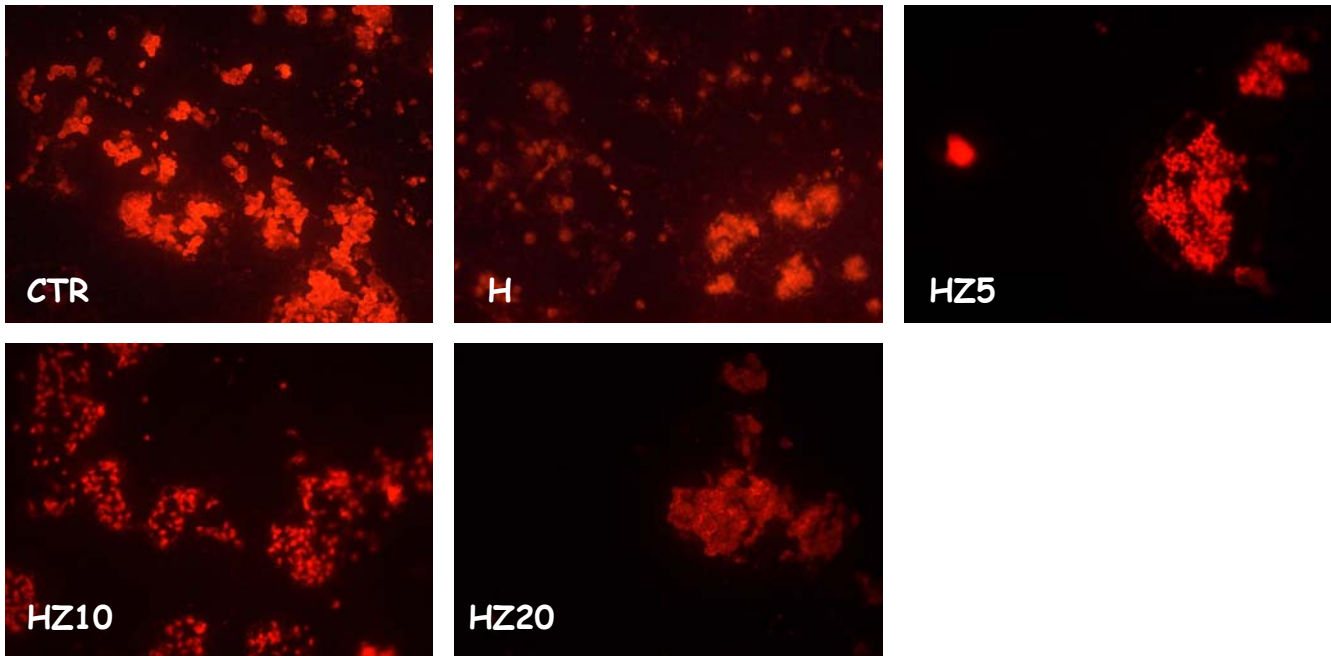


Fig.7 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE in proliferazione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione.
 Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

SK-N-BE : MORFOLOGIA CELLULARE DOPO 1 ORA



SK-N-BE : MORFOLOGIA CELLULARE DOPO 72 ORE

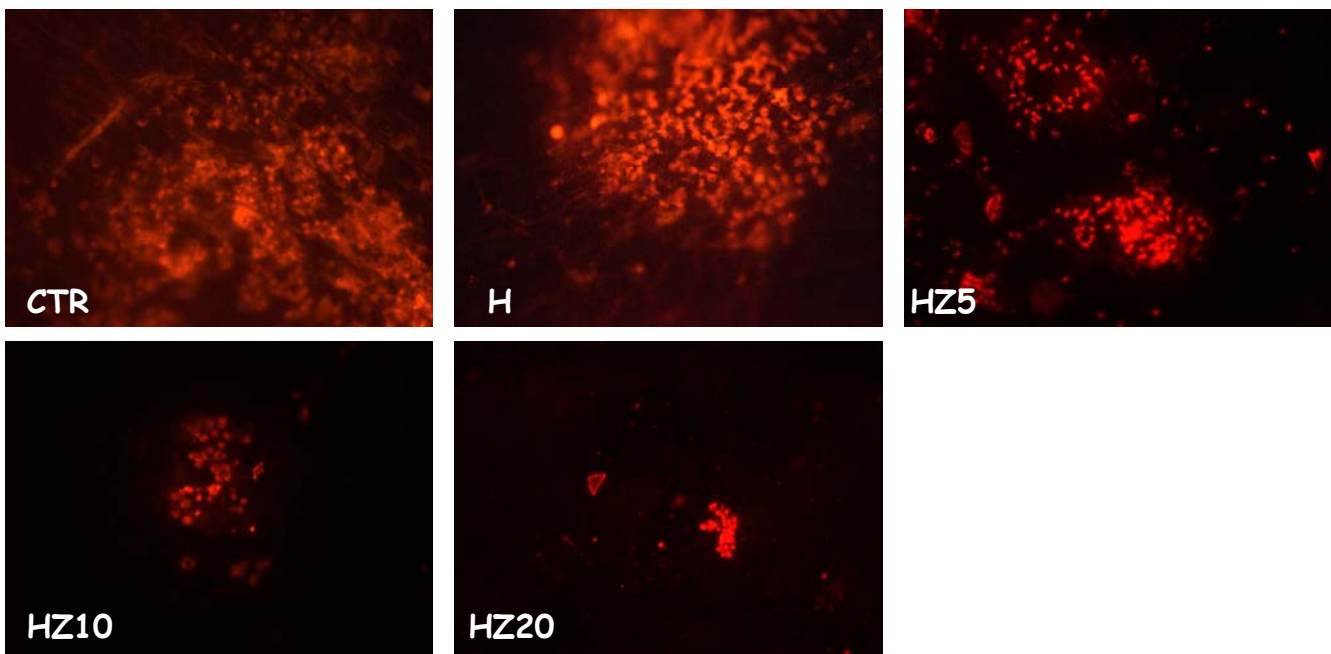


Fig.8: Immagini ottenute con Arancio di Acridina di cellule SK-N-BE adese a materiali dopati con zinco dopo 1 ora e dopo 72 ore di incubazione. Ingrandimento 20X.

CELLULE SK-N-BE + R.A.

I dati ottenuti sulle cellule SK-N-BE trattate con Acido Retinico per 10 giorni sono rappresentati in Fig.9 ed in Fig.10.

Come si può osservare dal grafico relativo all'adesione cellulare (Fig.9), la percentuale di cellule che già dopo un'ora di incubazione rimangono adese ai materiali è particolarmente elevata, con un valori quasi prossimi al 80%, sia su H sia su tutti i materiali dopati con zinco. Nelle ore successive si assiste ad una diminuzione dei valori costante e progressiva fino ad arrivare, dopo 12 ore di coltura, a valori poco più elevati del 40% rispetto alle iniziali cellule seminate. Questo è quanto si è riscontrato su H, HZ5 e HZ10; differenti sono stati i dati ottenuti su HZ20. Su questo materiale infatti, dopo una già citata consistente adesione iniziale, la percentuale di cellule rimaste adese è aumentata progressivamente fino ad arrivare, dopo 6 ore, a più del 90% rispetto a quelle seminate inizialmente. A 12 ore anche su HZ20 si è osservata una drastica diminuzione di cellule, con valori del tutto paragonabili a quelli degli altri materiali.

Per quanto riguarda i processi proliferativi (Fig.10), i dati ottenuti sono molto più eterogenei e completamente in contrasto rispetto ai corrispondenti dati ottenuti con le SK-N-BE non trattate con Acido Retinico. In questo caso infatti si è riscontrato un aumento significativo di cellule tra le 12 e le 24 ore di incubazione, su tutti i materiali trattati. Su H poi si è osservata la diminuzione della percentuale di SK-N-BE + R.A. in modo progressivo fino alle 72 ore, con un valore finale di cellule adese corrispondente a circa il 30% rispetto a quelle iniziali. Dati differenti si sono ottenuti su HZ5 dove, dopo 48 ore, la quantità di cellule adese al materiale è risultata essere praticamente equivalente a quella valutata dopo 24 ore; successivamente anche su questo materiale si è riscontrata una diminuzione di cellule a 72 ore, con valore finale comunque significativamente superiore al corrispondente valore su H. Su HZ10 e HZ20 i dati ottenuti sono del tutto simili tra loro, con un incremento notevole di cellule riscontrato

dopo 48 ore rispetto alle 24 ore, con valori significativamente superiori ai corrispondenti su H e HZ5. Dopo 72 ore di coltura anche su questi materiali si è riscontrata però la diminuzione di proliferazione già valutata sugli altri substrati, con percentuale di cellule finale corrispondente a circa il 60%, significativamente superiore comunque a quella ottenuta su H.

Come per le SK-N-BE, anche per le cellule differenziate con Acido Retinoico, sono state fatte colorazioni con Arancio di Acridina, su tutti i materiali e a tutti gli intervalli di tempo considerati, al fine di valutare la morfologia delle cellule seminate. A differenza delle SK-N-BE, queste sono cellule che non tendono a formare piccoli aggregati fra di loro, ma esprimono prolungamenti di tipo dendritico e assonale. Data l'irregolarità di superficie dei materiali utilizzati, anche in questo caso, è stata spesso difficoltosa l'acquisizione di immagini al microscopio. Inoltre i prolungamenti visibilmente evidenti sulla plastica di controllo (CTR) non sono invece risultati apprezzabili sui biovetri.

Le immagini ottenute sono presentate in Fig.11, dove vengono riportate anche qua per semplicità solamente quelle dopo 1 ora e dopo 72 ore di incubazione, su tutti i materiali seminati. Come si può osservare la morfologia cellulare varia in modo significativo dal controllo ai materiali, inoltre si può notare la variazione della densità cellulare sui diversi substrati rispetto alla plastica di controllo, nonché quella tra un'ora e 72 ore sui biovetri.

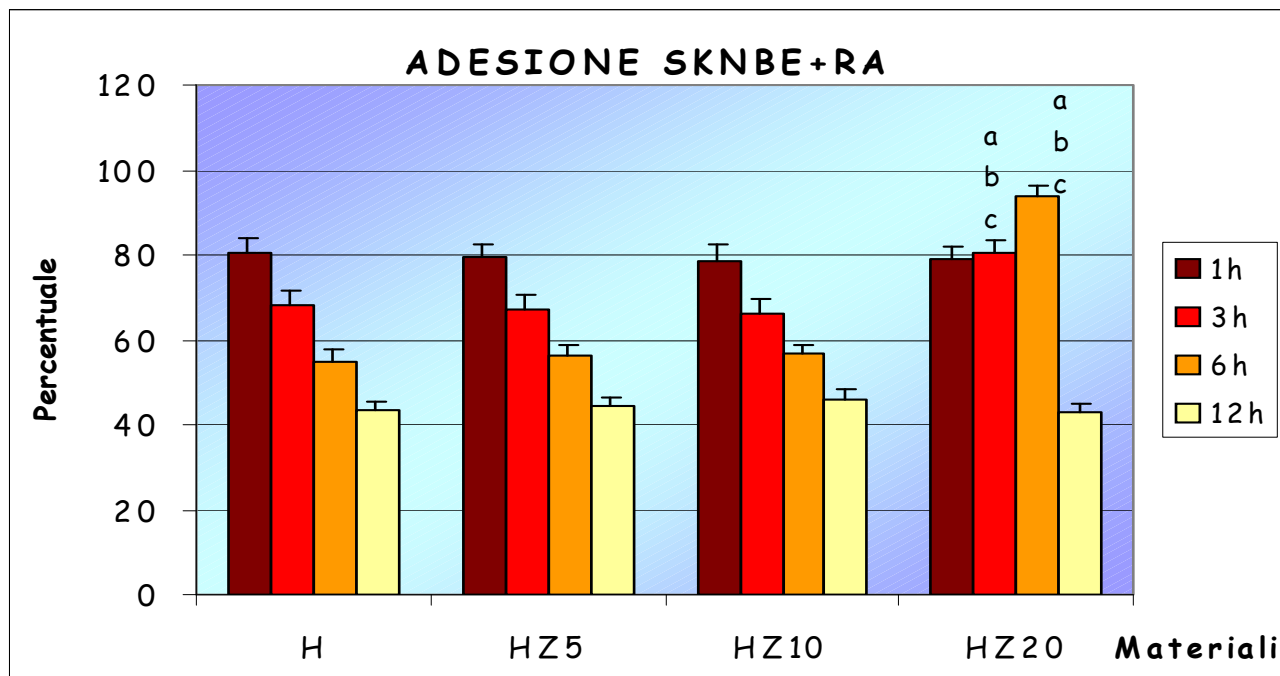


Fig.9 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE + R.A. in adesione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione. Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

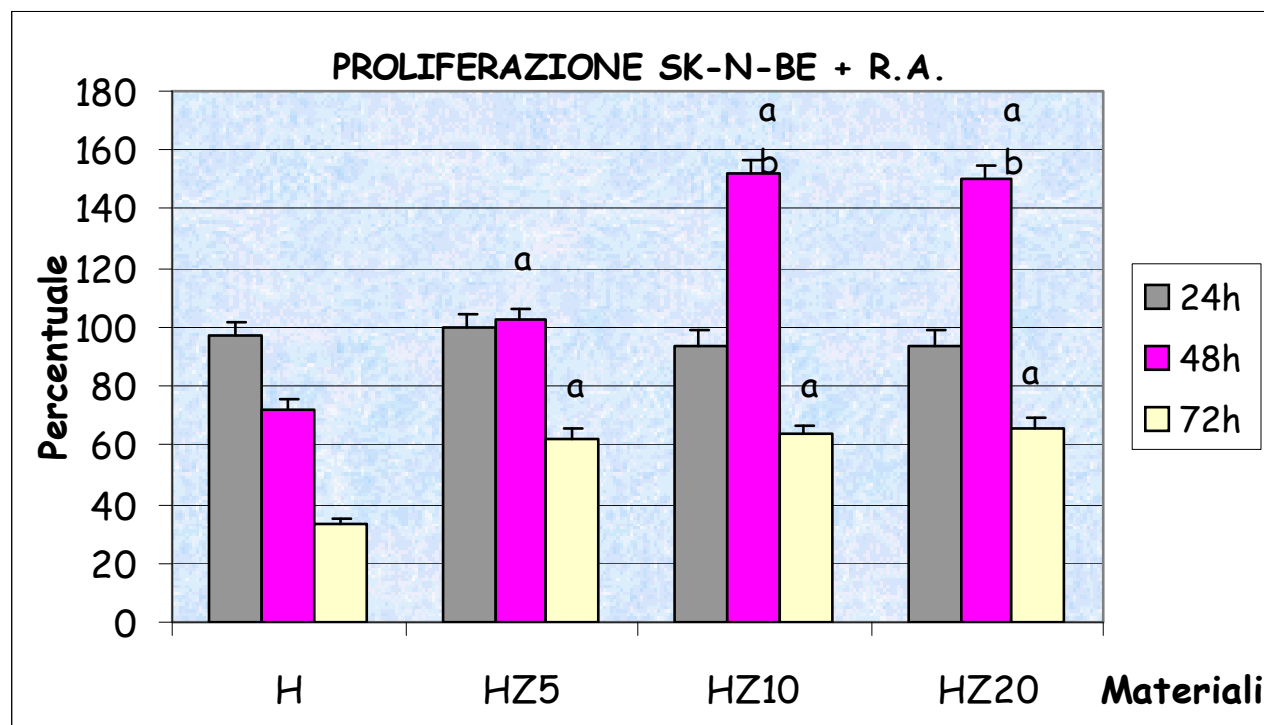
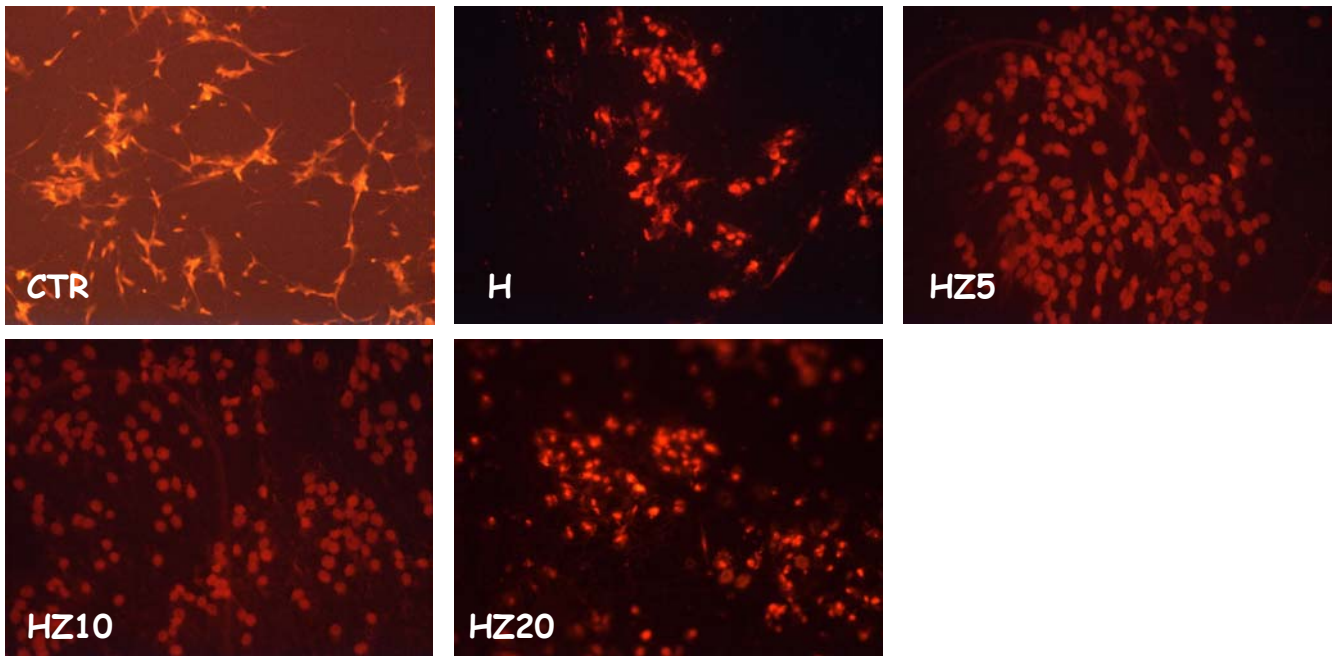


Fig.10 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE + R.A. in proliferazione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione. Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

SK-N-BE + R.A. : MORFOLOGIA CELLULARE DOPO 1 ORA



SK-N-BE + R.A. : MORFOLOGIA CELLULARE DOPO 72 ORE

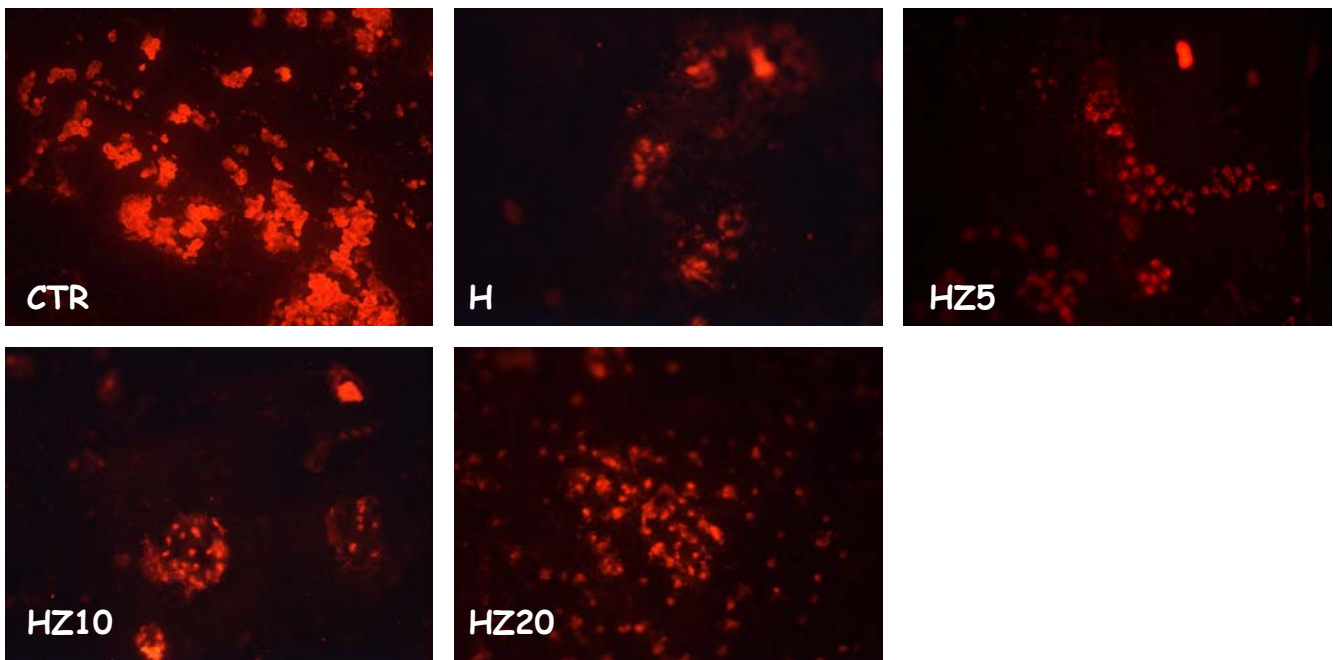


Fig.11: Immagini ottenute con Arancio di Acridina di cellule SK-N-BE + R.A. adese a materiali dopati con zinco dopo 1 ora e dopo 72 ore di incubazione. Ingrandimento 20X.

WESTERN BLOT

L'espressione di β IIITubulina, di GAP-43 e del Neurofilamento nelle cellule SKNBE e nelle SKNBE+RA adese alla plastica è stata valutata con Western Blot e le immagini ottenute sono riportate in Fig.12.

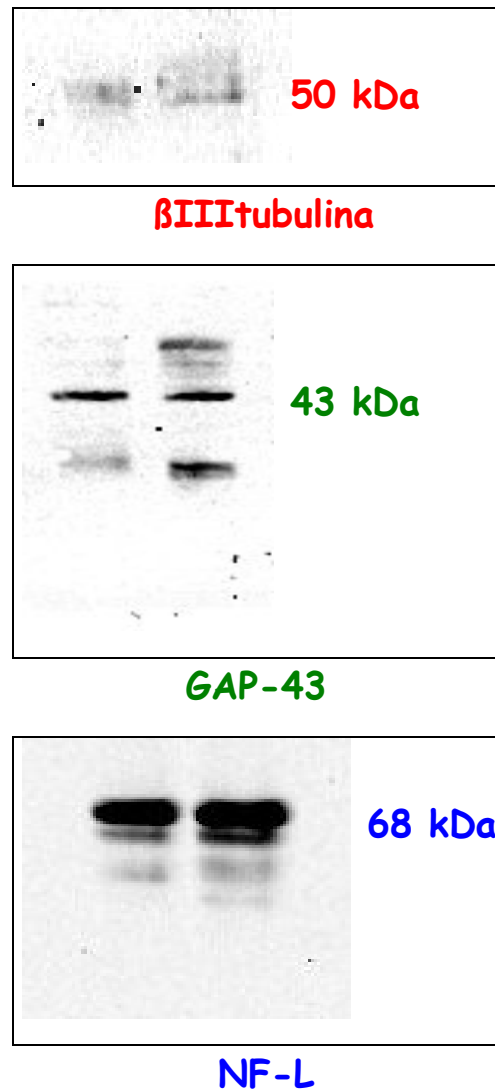


Fig.12 : Immagini ottenute da Western Blot di β IIITubulina, di GAP-43 e del Neurofilamento su lisati di SK-N-BE e SK-N-BE + R.A. coltivate su plastica.

Banda a sinistra : SK-N-BE + R.A

Banda a destra : SK-N-BE

Come si può osservare, entrambe le tipologie cellulari esprimono la β III tubulina, il GAP-43 ed il Neurofilamento. Per quanto riguarda la β III tubulina si può notare che viene maggiormente espressa dalle SK-N-BE rispetto alle stesse cellule trattate con Acido Retinoico. GAP-43 viene espresso in modo equivalente da entrambe le tipologie cellulari, mentre il Neurofilamento risulta essere più evidente per SK-N-BE rispetto a SK-N-BE + R.A.. Da questi dati preliminari presumiamo che l'adesione su plastica non modifichi significativamente questi marker neuronali specifici nelle SK-N-BE + R.A. rispetto alle stesse cellule non trattate con Acido Retinoico. Ulteriori analisi sono ancora in corso, per valutare l'espressione di queste proteine quando le cellule sono a contatto con i diversi materiali.

Western blot sono stati eseguiti anche per valutare la presenza o meno di marker apoptotici, quali la caspasi-8, la caspasi-9 e la caspasi-3 nelle loro forme attivate, sui lisati ottenuti dalle cellule staccate dai materiali presenti nel terreno di coltura. Non si sono ottenuti risultati apprezzabili.

DISCUSSIONE

I materiali da noi trattati sono substrati che, come detto in precedenza, presentano una struttura chimica piuttosto complessa, in cui gli ioni coinvolti tendono a formare strutture cristalline impaccate ed i legami interessati sono Forze di Van der Waals. L'impaccamento aumenta in modo proporzionale all'aumento di zinco nei diversi materiali, determinando una distribuzione complessiva di carica superficiale sempre meno evidente con l'aumento di zinco. H infatti presenta una carica superficiale complessiva positiva data da ioni Na^+ mobili, carica che viene invece a venir meno negli altri materiali dove lo ione zinco, sotto forma di Zn^{2+} (ZnO_4^{2-}), rende la struttura più compatta ed annulla la carica positiva superficiale.

Partendo da questi concetti ed integrando i nostri risultati con altri già ottenuti in altri lavori (21) possiamo arrivare ad affermare le seguenti conclusioni.

L'elevata percentuale di cellule SK-N-BE adese ai materiali dopo solo un'ora di adesione potrebbe essere il risultato di una semplice interazione di carica tra le cellule e la superficie stessa dei materiali; un'ora è un tempo troppo breve perché le cellule possano esprimere effettivamente le loro proteine d'adesione, pertanto i legami coinvolti potrebbero essere esclusivamente di natura chimica. Il fatto inoltre che le SK-N-BE adese al materiale di Hench originale siano, dopo un'ora, in percentuale inferiori a quelle adese sugli altri materiali, può farci presupporre che su H gli ioni Na^+ disturbino l'attacco delle cellule che necessitano invece di cariche negative per poter aderire correttamente. Nei materiali dopati con zinco invece queste cariche superficiali positive diminuiscono, la struttura è più compatta, meno aspra e questo potrebbe determinare un ambiente d'adesione, da un punto di vista architettonico, più favorevole per le cellule.

La diminuzione di cellule adese riscontrata su tutti i materiali dopo tre ore di incubazione potrebbe trovare spiegazione considerando che, a questo livello, le cellule sarebbero già in grado di percepire che non si trovano in un ambiente propriamente favorevole per loro.

I materiali, sebbene compatibili, non rappresentano infatti una struttura biologica naturale, pertanto le SK-N-BE potrebbero non riconoscere il substrato su cui sono poste come superficie extracellulare e tenderebbero così a staccarsi. A questo livello la diversa percentuale di zinco contenuta nei materiali non rappresenterebbe un fattore determinante per il comportamento cellulare.

L'ulteriore diminuzione percentuale delle cellule adese riscontrata dopo sei ore su tutti i materiali considerati troverebbe giustificazione ancora nelle motivazioni descritte in precedenza, in quanto, da studi preventivamente condotti su plastica come controllo, si è potuto osservare che tra tre e sei ore di incubazione tali cellule non subiscono particolari cambiamenti comportamentali e strutturali.

Dopo 12 ore di coltura invece si è riscontrato un incremento di cellule in adesione, su tutti i materiali. Questo dato ci ha portato a considerare che probabilmente, a questo livello, le SK-N-BE potrebbero cominciare a modificare le loro strutture proteiche di membrana per poter favorire un processo adesivo; processo questo non più basato sul rapporto di carica cellula-substrato ma bensì su interazioni di tipo strutturale. Sarà uno step successivo nel nostro lavoro andare a valutare se, a questo livello, si riscontrano per esempio contatti focali delle SK-N-BE sui materiali trattati. L'ipotesi potrebbe avere il suo effettivo riscontro perché è stato valutato in altri lavori(21) che diverse tipologie cellulari seminate sui materiali di Hench e sui derivati dopati con zinco, mostrano, a partire da 12 ore di coltura, una buona morfologia di crescita, con proteine d'adesione (vinculina) ampiamente espresse, sebbene in modo dipendente dalla concentrazione di zinco nei materiali.

Su tutti i materiali si è riscontrata una drastica diminuzione di cellule al primo intervallo proliferativo considerato (24 ore); tale andamento potrebbe trovare giustificazione se si considera che le cellule, per potersi duplicare, necessitano di un distacco, anche se minimo, dal substrato su cui si trovano. Nel caso in cui questo substrato non rappresenti

già di per sé una base di crescita ottimale, un' ulteriore riadesione sarebbe alquanto improbabile. Da qui la caduta dei picchi d'adesione riscontrata a 24 ore. Le cellule rimaste adese ai materiali vanno comunque incontro ad un normale processo proliferativo; su H e HZ5 si riscontra infatti un aumento di cellule dopo 48 ore. Su questi materiali le SK-N-BE troverebbero così delle condizioni proliferative favorevoli, a differenza di quanto succede su HZ10 e HZ20 dove la proliferazione è limitata (HZ10) o addirittura sfavorita (HZ20). Un aumento di concentrazione di zinco, e quindi di impaccamento della struttura, rappresenterebbe così un elemento sfavorevole alla proliferazione cellulare. Si stanno ancora ricercando comunque dei dati che giustifichino ulteriormente questo comportamento cellulare.

Consideriamo ora i risultati ottenuti con le SK-N-BE trattate con Acido Retinoico.

Queste cellule, come precedentemente descritto, presentano un'espressione matura delle integrine di membrana (3), proteine essenziali per l'adesione cellulare, e questo fenomeno potrebbe rappresentare in parte una spiegazione dei dati ottenuti.

L'elevata percentuale di cellule adese ai materiali riscontrata dopo un'ora di incubazione potrebbe essere giustificata sempre come un'interazione di carica tra cellule e substrato, come per le SK-N-BE, ma, in questo caso, il legame sarebbe verosimilmente coadiuvato dalle integrine di membrana. Queste sono proteine d'adesione che cercano comunque fattori specifici di legame, quali fibronectina, laminina o collagene per poter compiere correttamente il loro compito; i materiali da noi trattati non presentano queste proteine e le cellule a contatto inizierebbero una destabilizzazione della fase adesiva riscontrata a partire da tre ore di coltura fino a 12 ore. Questo è quanto potrebbe succedere alle SK-N-BE + R.A. seminate su H, HZ5 e HZ10 dove, come mostrato in Fig.9, si assiste ad una diminuzione progressiva della percentuale di cellule in adesione nell'intervallo di tempo considerato. Diversi sono invece i risultati ottenuti su HZ20, dove si è riscontrato un aumento di adesione tra una, tre e sei ore di coltura, seguito da una

diminuzione drastica anche in questo caso. Su HZ20 le integrine sembrerebbero trovare delle condizioni favorevoli all'adesione nella struttura chimica del materiale. Questo materiale è il più ricco di zinco fra quelli considerati ed è quello che, quindi, presenta la struttura più impaccata, più liscia; si può ipotizzare che questa condizione consenta alle integrine di conferire alle cellule maggiore stabilità sul substrato, ritardando il loro distacco a 12 ore, anzichè a tre come negli altri casi. Dodici ore rappresentano infatti un tempo già sufficientemente lungo affinché la cellula sia in grado di percepire che il substrato su cui si trova non presenta gli specifici fattori di legame.

Per quanto riguarda la proliferazione, i dati ottenuti mettono in evidenza una percentuale di cellule adese a 24 ore equivalente su tutti i materiali trattati, percentuale maggiore rispetto alle 12 ore perché, in questo lasso di tempo, le cellule sedimentate sui materiali sarebbero comunque andate incontro a processi proliferativi. Su H si assiste poi ad una diminuzione progressiva nei tempi successivi che potrebbe trovare la sua spiegazione negli stessi presupposti espressi per l'adesione. Su HZ5, HZ10 e HZ20 si è riscontrato invece un aumento (minimo su HZ5) dopo 48 ore di coltura ed una diminuzione dopo 72 ore; ancora una volta questo andamento potrebbe essere giustificato considerando la struttura chimica dei materiali ed il loro impaccamento. Superfici via via più lisce determinerebbero condizioni favorevoli per la proliferazione cellulare entro un lasso di tempo comunque limitato; prevarrebbe poi l'assenza di fattori specifici sui substrati e da qui la nuova diminuzione a 72 ore.

I dati ottenuti dai Western Blot mettono in evidenza che entrambe le tipologie cellulari da noi considerate esprimono, su un substrato di controllo, le proteine β III tubulina, GAP-43 e Neurofilamento. Sarà un passo successivo nel nostro lavoro andare a verificare se quest'espressione viene modificata seminando le cellule sui materiali e se la diversità dei materiali stessi determinerà differenze nell'espressione proteica.

Sono stati condotti studi anche per determinare se le cellule che si staccano dai materiali vanno incontro a morte apoptotica. I Western Blot fatti sui lisati cellulari ottenuti dai terreni di coltura hanno dato risultato negativo alla caspasi 8, alla caspasi nove ed alla caspasi 3 nelle loro forme attive; i risultati preliminari metterebbero in evidenza quindi che le cellule che si staccano dai materiali non vanno incontro a processi apoptotici ma il loro distacco sarebbe quindi solo condizionato dalle strutture chimiche dei substrati e dalle interazioni ed espressioni proteiche di membrana, come ipotizzato in precedenza.

CONCLUSIONI

Sebbene si debbano ancora compiere esperimenti per approfondire e spiegare ulteriormente quanto osservato fino ad ora, dai dati che possediamo possiamo concludere quanto segue.

Superfici inorganiche contenenti zinco, esprimono diversi livelli di impaccamento cristallino sono in grado di definire interazioni funzionali con elementi biologici dell'adesione cellulare.

L'espressione matura di integrine diventa un fattore dominante nel comportamento adesivo delle cellule che esprime favore rispetto ad una superficie impaccata (liscia). Rimane pur sempre un comportamento di ricerca del substrato specifico che tiene conto della diminuzione di adesione cellulare osservata nei tempi più lunghi (72 ore).

BIBLIOGRAFIA

1. Brodeur GM 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203-216
2. Chambaut-Guerin AM, Martinez MC, Hamimi C, Gauthereau X, Nunez J. Tumor necrosis factor receptors in neuroblastoma SKNBE cells and their regulation by retinoic acid. *J Neurochem.* 1995 Aug;65(2):537-44.
3. Bozzo C., Sabbatini M. et all. Activation of caspase-8 triggers anoikis in human neuroblastoma cells. *Neuroscience Research* 56 (2006)145-153.
4. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.*, 5: 2924-2933, 1991.
5. Mendelsohn C., Lohnes D., Decimo D., Lufkin T., LeMeur M., Chambon P., and Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development*, 120: 2749-2771, 1994.
6. Ross S. A., McCaffery P. J., Drager U. C., and De Luca L. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80: 1021-1054, 2000.
7. Mangelsdorf D. J., and Evans R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850, 1995.
8. Zhang, X. K., and Pfahl, M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 4: 156-162, 1993.
9. Aranda A, Pascual A 2001 Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.
10. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. 2006 International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58:712-725

11. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H 2006 International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58:760-772
12. T. Kokubo, H.M. Kim and M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials* 24 (2003), pp. 2161-2175.
13. D.E. Steflik, R.S. Corpe, F.T. Lake, T.R. Young, A.L. Sisk, G.R. Parr, P.J. Hanes and D.J. Berkery, Ultrastructural analyses of the attachment (bonding) zone between bone and implanted biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998), pp. 611-620.
14. V.J. Shirliff and L.L. Hench, Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair, *J. Mater. Sci.* 38 (2003), pp. 4697-4707
15. P. Saravanapavan, J.R. Jones, S. Verrier, R. Beilby, V.J. Shirliff, L.L. Hench and J.M. Polak, Binary CaO-SiO₂ gel-glasses for biomedical applications, *Biomed. Mater. Eng.* 14 (2004), pp. 467-486.
16. A. Oki, B. Parveen, S. Hossain, S. Adeniji and H. Donahue, Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials, *J. Biomed. Mater. Res. A* 69 (2004), pp. 216-221.
17. J. Brandão-Neto, V. Stefan, B.B. Mendonça, W. Bloise and A.V.B. Castro, The essential role of zinc in growth, *Nutr. Res.* 15 (1995), pp. 335-358
18. Z.-L. Tang, K. Wasserloos, C.M. St. Croix and B.R. Pitt, Role of zinc in pulmonary endothelial cell response to oxidative stress, *Am. J. Physiol. (Lung)* 281 (2001), pp. 243-249.
19. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M.C. Menziani, Synthesis, characterization, and molecular dynamics simulation of Na₂O-CaO-SiO₂-ZnO glasses, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002), pp. 9753-9760
20. L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli and U. Segre, Qualitative and quantitative structure-property relationships analysis of multicomponent potential bioglasses, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005), pp. 4989-4998.

21. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M.C. Menziani et all, Properties of zinc releasing surfaces for clinical applications, Journal of biomaterials applications, volume 00- 2007.

SEMINARI SEGUITI

29/11/2006 - "NUOVE FRONTIERE DEI BIOMATERIALI:APPLICAZIONI CLINICHE"
- Prof. Rolando Barbucci, Facoltà di Farmacia, Dipartimento di Chimica, Università di Siena.

12/01/2007 -"AUTOANTIBODIES IN SYSTEMIC SCLEROSIS: FROM CLINICAL SUBSETS TO PATHOGENIC FUNCTIONS" - Prof. Chizzolini

18/01/2007 - "PATOGENESI DEL DIABETE MELLITO DI TIPO I: STIAMO PERDENDO O STIAMO VINCENDO?" - Prof. Franco Bottazzo, Direttore Scientifico, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma.

25/01/2007 - "NUOVI RUOLI PER LE PROTEINE ADATTATRICI p130CAS E p140CAP NELLA TRASFORMAZIONE TUMORALE E NEL CARCINOMA ALLA MAMMELLA" - Prof.ssa Paola Defilippi, Dip. di genetica, biologia e biochimica, Università degli studi di Torino, Center for Experimental Research and Medical Studies, CERMS, e Molecular Biotechnology Center, Torino.

22/02/2007 - "FRAGILE X SYNDROME FROM RNA METABOLISM IMPAIRMENT TO SPINE DYSMORPHOGENESIS " - prof.ssa Claudia Bagni, Roma.

14/03/2007 - "PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SURFACES FOR IMPROVED SENSITIVITY" - DR. Marina Cretich, Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare-ICRM, Milano.

15/03/2007 - " LE COLANGIOPATIE AUTOIMMUNI" - Prof. Mauro Podda- Università degli Studi di Milano, Ospedale San Paolo.

29/03/2007 - "MARCATORI FARMACOGENOMICI NEL CARCINOMA COLORETTALE: QUALI PROSPETTIVE PER UNA TERAPIA PERSONALIZZATA?" - PROF. ENRICO MINI, PROFESSORE ORDINARIO DI FARMACOLOGIA, DIPARTIMENTO DI FARMACOLOGIA PRECLINICA E CLINICA "M. AIAZZI MANCINI", UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE.

19/04/2007 - "PATHOFENIC VIRUSES: SMART MANIPULATORS OF THE INTERFERON SYSTEM" - Prof. Otto Haller- Istituto di Virologia, Università di Friburgo.

16/05/2007 - "DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR" - Simona Ferrari - Università di Bologna.

23/05/2007 - "PREDISPOSIZIONE GENETICA AL CANCRO POLMONARE" - Dott. Tommaso A. Dragani, Head Research Unit, "Polygenic Inheritance", Fondazione IRCCS Istituto Nazionale Tumori, Milano

25/05/2007 - "THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALING" - Stefan Karlsson Ph.D. M.D., Professor of Molecular Medicine, Molecular Medicine and Gene Therapy, Lund Strategic Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy, Lund University, Sweden.

28/05/2007 - "TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR SHWACHMAN DIAMOND SYNDROME" - Steven R. Ellis Ph.D., Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Louisville, Louisville KY 40202 USA.

29/05/2007 - "RISK ASSESSMENT FOR PESTICIDES " - Prof. David Coggon, Environmental Epidemiology Unit, Medical Research Council, Southampton (UK)

4/06/2007 - "SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE" - Prof. Alberto MARTINI, Università di Genova

14/06/2007 - "LA GENESI DEI GLIOMI E I SUOI RISVOLTI PROGNOSTICI E TERAPEUTICI" - Davide Schiffer Ph.D. M.D., Professore Emerito di Neurologia, Università di Torino, Direttore Centro di Neuro-Bio-oncologia della Fondazione Policlinico di Monza.

21/06/2007 - "BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSIS OF UTRs AND FOR THE PREDICTION OF ALTERNATIVE SPLICED TRANSCRIPTS" - DOTT. FLAVIO MIGNONE PH.D, Dip. Chimica Strutturale e Stereochimica Inorganica, UNIVERSITÀ DI MILANO

CORSO SEGUITO

Corso di statistica medica, Prof. Magnani - Anno 2006

PARTECIPAZIONI

- Convegno dal titolo "**L' Adesione Proteica e il Comportamento Cellulare in Presenza di Vetri Bioattivi (Zn-releasing)**" in data 30 / 06 / 2005, presso la facoltà di Chimica dell' Università di Torino.

- XVI CONVEGNO NAZIONALE GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELLA NEUROMORFOLOGIA

(G.I.S.N.)

Bologna 23 - 24 Novembre 2006

M. Sabbatini, C. Molinari, E. Grossini, V. Piffanelli, G. Vacca, M. Cannas

GABA_A receptors expression in hindbrain nuclei following low pressure mechanical distension of stomach in the rat. Abstract book

- 32nd NATIONAL CONGRESS OF THE ITALIAN SOCIETY OF HISTOCHEMISTRY

Messina 31 Maggio -02 Giugno 2007

M. Sabbatini, C. Molinari, E. Grossini, V. Piffanelli, G. Vacca, M. Cannas

GABA_A-ergic forebrain pathways following mecano-gastric receptors stimulation in the rat.

Eur.J. Histochem. 51 (Suppl. 2): pg. 10; 2007.

PUBBLICAZIONI:

"Activation of caspase 8 triggers anoikis in human neuroblastoma cells"

Chiarella Bozzo^a, Maurizio Sabbatini^a, Rossana Tiberio^a, **Valentina Piffanelli^a**, Claudio Santoro^b, Mario Cannas^a.

^a Department of Clinical And Experimental Medicine, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy.

^b Department of Medical Science, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy.
Neuroscience Research 56 (2006)145-153

"Behaviour of human mesenchymal stem cells on a polyelectrolyte-modified hema-hydrogel for ligament tissue engineering"

Bosetti M., Boccafoschi F., Calarco A., **Piffanelli V.**, Peluso G., Cannas M.

(submitted "Journal of Biomaterial Science - polymeric edition")

"GABAA-ergic forebrain pathways following mecano-gastric receptors stimulation in the rat".

M. Sabbatini, C. Molinari, E. Grossini, **V. Piffanelli**, G. Vacca, M. Cannas

Department of Clinical And Experimental Medicine, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy.

Eur.J. Histochem. 51 (Suppl. 2): pg. 10; 2007.

"Immunoistochemical signals of apoptotic pathways in several types of meningioma"

M. Sabbatini^a, C. Comi^b, A. Chiochetti*, **V. Piffanelli^a**, P. Car^o, U. Dianzani*, F. Monaco^b and M. Cannas^a

^aLaboratorio di Anatomia Umana, *Laboratorio di Immunologia, ^bClinica Neurologica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale, Novara. ^o Reparto di Neurochirurgia Ospedale Maggiore della Carità, Novara

(submitted: *Neurosci Letters*)

"Different modalities of apoptosis in periprosthetic membranes"

M. Sabbatini, **V. Piffanelli**, F. Boccafoschi, S. Gatti, F. Reno', M. Bosetti, Massè A. ^o, M. Cannas.

Human Anatomy Laboratory, Research Center for Biocompatibility, Clinical and Experimental Medicine Department, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy.

^oCTO, University of Turin, Department of Orthopaedics, Traumatology and Occupational Medicine.

(submitted Journal of Biomedical Materials Research:part A)

"GABA_a receptors expression pattern in rat brain following low pressure distention of the stomach"

M. Sabbatini^a, C. Molinari^b, E. Grossini^b, V. Piffanelli^a, D.Mary^b, G. Vacca^b, M. Cannas^a

^a Laboratorio di Anatomia Umana, ^b Laboratorio di Fisiologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università del Piemonte Orientale, Novara.

(submitted Neuroscience)