

Università degli Studi del Piemonte
Orientale "Amedeo Avogadro"



Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare

Ciclo XX

Relazione 4° anno

STUDIO DI CELLULE DI NEUROBLASTOMA SK-N-BE SU
BIOVETRI DOPATI CON ZINCO.

Candidato: Valentina Piffanelli

Tutor: Prof. Mario Cannas

INTRODUZIONE

NEUROBLASTOMA e CELLULE SK-N-BE

Il neuroblastoma è un tumore che colpisce le cellule nervose dei gangli simpatici. È considerato di origine ereditaria, ed è uno dei più frequenti nell'infanzia.

Questo fa parte di una più ampia famiglia di tumori che istologicamente originano dalle cellule del primitivo tessuto neuroectodermico della cresta neurale. Il neuroblastoma produce spesso catecolamine (per questo è detto secernente), determinandone alti livelli nelle urine e nel sangue, utili per la diagnosi. Può colpire soprattutto la ghiandola surrenale, presentandosi come una tumefazione addominale, i gangli simpatici paraspinali, potendo comparire in qualsiasi tratto della colonna vertebrale (addominale e toracica). Segni frequenti di malattia sono: febbre, anemia, disappetenza, ecchimosi intorno alle orbite. Le metastasi, frequenti e precoci, colpiscono le ossa, la regione dell'orbita, i linfonodi, il fegato e il midollo osseo. La diagnosi precoce è fondamentale, poiché se si interviene nei primi stadi di malattia la sopravvivenza è elevata; a tale fine vanno ricercati i metaboliti urinari delle catecolamine (acido vanilmandelico, acido omovanillico); va valutata l'estensione della malattia con indagini radiologiche standard, TAC, risonanza magnetica nucleare, urografia ed eventualmente mielografia; va eseguito, per confermare definitivamente la natura della malattia, un esame del midollo osseo e, se necessario, un prelievo biptico della massa neoplastica nella sede più facilmente aggredibile.

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 probabilità di guarigione (prognosi) e

la scelta del trattamento dipendono dallo stadio del tumore (se si è diffuso ad altri organi), nonché dall'età del bambino all'atto della diagnosi, dalla localizzazione del tumore e dal risultato della biopsia con riferimento al tipo cellulare.

Terapia

Tutti i pazienti portatori di neuroblastoma possono essere sottoposti a trattamento.

Esistono quattro opzioni terapeutiche:

- chirurgia, che consiste nell'asportazione del tumore;
- radioterapia, che utilizza dosi elevate di raggi X per distruggere le cellule tumorali;
- chemioterapia, che consiste nella somministrazione di farmaci che distruggono le cellule tumorali;
- trapianto di midollo osseo, che ha lo scopo di sostituire il midollo osseo (malato) con midollo osseo sano.

Un tipo particolare di trapianto autologo utilizza le cellule staminali periferiche (cellule immature da cui originano tutte le cellule ematiche) del paziente.

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. 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, in seguito a trattamento con acido retinoico, definiscono in membrana un pattern specifico di integrine che le rendono

sensibili alle condizioni di adesione ambientale. Una tale proprietà non si nota in cellule SK-N-BE non trattate.

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 sopravvivenza, la differenziazione ed il controllo della crescita cellulare (3). La perdita della capacità di adesione, come pure l'induzione di un' eccessiva adesività sono 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 (famiglie), sulla base di criteri strutturali e funzionali: integrine, caderine, selectine. La famiglia delle integrine è quella che principalmente esplica il controllo dei pattern cellulari che sovrintendono alla sopravvivenza e differenziazione. Le integrine sono costituite 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 dipende dal dominio extracellulare della subunità α . La subunità β è invece indispensabile per la funzionalità dell'integrina, presenta ripetizioni tandem di quattro regioni ricche di residui di cisteina, che sono considerate essenziali per il mantenimento della struttura tridimensionale della molecola.

Sul lato extracellulare le integrine uniscono proteine specifiche di matrice extracellulare al citoscheletro. Tra le proteine legate si trovano fibronectina, collagene I e laminina, ben note per le loro proprietà di stimolare la sopravvivenza e la differenziazione cellulare. Le integrine si localizzano nelle placche focali, strutture adesive in cui avviene il contatto tra la matrice extracellulare ed i componenti del citoscheletro.

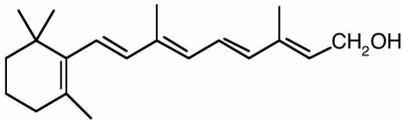
I collegamenti tra l'integrina, i legami nella matrice e i microfilamenti all'interno della cellula sono indiretti: essi sono connessi mediante proteine "armatura" come la talina, paxillina e l'alpha-actinina. Queste agiscono regolando le chinasi come le FAK (focal adhesion kinase - chinasi di adesione focale) e la famiglia delle chinasi Src ai substrati fosforilati come per esempio il p130CAS o reclutando adattatori di segnale.

Le integrine interagiscono anche con segnali provenienti dai recettori dei fattori di crescita solubili quali il VEGF, l' EGF e altri, determinando la decisione cellulare su quale azione biologica intraprendere: collegamento, movimento, morte o differenziazione.

Sul lato intracitoplasmatico le integrine interagiscono con il citoscheletro, requisito fondamentale sia per i fenomeni di adesione delle cellule alla matrice, sia per quelli di adesione tra le cellule stesse. La connessione modulabile con il citoscheletro fa aumentare la capacità di legame dell'integrina per il suo specifico ligando. Queste interazioni permettono alle cellule normali di avere la percezione diretta del profilo di adesione fornendo un segnale di sopravvivenza, la cui mancanza comporta la perdita del controllo del meccanismo di crescita cellulare e frequentemente la morte di tipo apoptotico. Alterazioni di tali interazioni possono d'altra parte attivare segnali intracellulari impropri che portano all' aumentata sopravvivenza e motilità che caratterizzano le cellule tumorali.

Da esperimenti condotti nel nostro laboratorio è noto che le cellule SKNBE trattate con acido retinoico esprimono in membrana un maggior numero di integrine adatte ai legami con proteine specifiche della matrice extracellulare quali collagene I, laminina, fibronectina, che mediano la sopravvivenza ed il differenziamento cellulare. In particolare sembra confermata l'aumentata espressione della subunità $\alpha 1$, ampiamente coinvolta nella formazione delle integrine di legame specifico (3-4-5-6).

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 (7-8). 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) (9-10). 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 (11-12-13).

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.1).

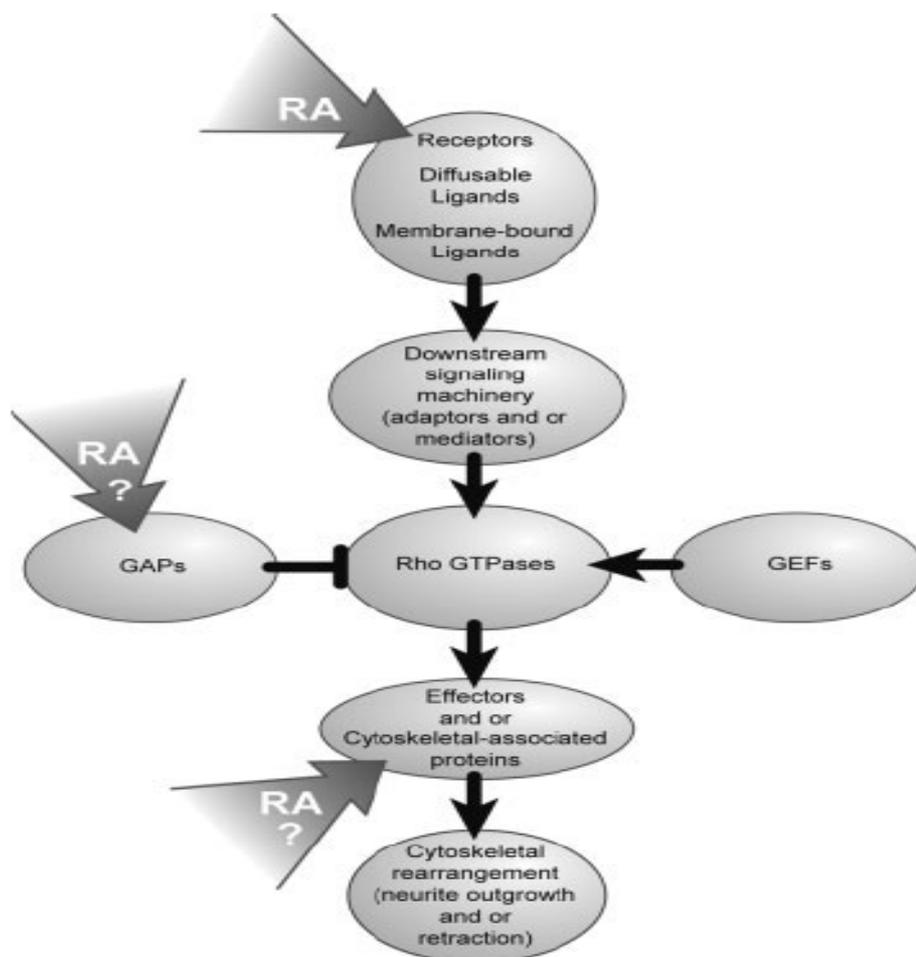


Fig. 1

Funzioni dell'acido retinoico e dei recettori nucleari

Per quel che riguarda l'attività antitumorale dei retinoidi, bisogna considerare che esistono molti fattori che possono contribuire alla nascita di un tumore come ad esempio le modificazioni geniche o la carcinogenesi chimica. I retinoidi possono interferire con questi fattori su vari livelli (Fig.2):

- (a) blocco della carcinogenesi chimica probabilmente grazie all'inibizione di AP-1.
- (b) induzione e stabilizzazione del differenziamento.
- (c) blocco del ciclo cellulare della cellula cancerogena in G1.
- (d) effetto apoptotico post-maturazione.
- (e) morte delle cellule premature ad opera solo dei «retinoidi» in certe condizioni.
- (f) induzione di apoptosi di cellule cancerogene (senza o in combinazione con agenti chemioterapici)

Le azioni principalmente note consistono nell'induzione del differenziamento e/o apoptosi di cellule tumorali e nell'inibizione della propagazione tumorale nei casi di cancro chimicamente indotti.

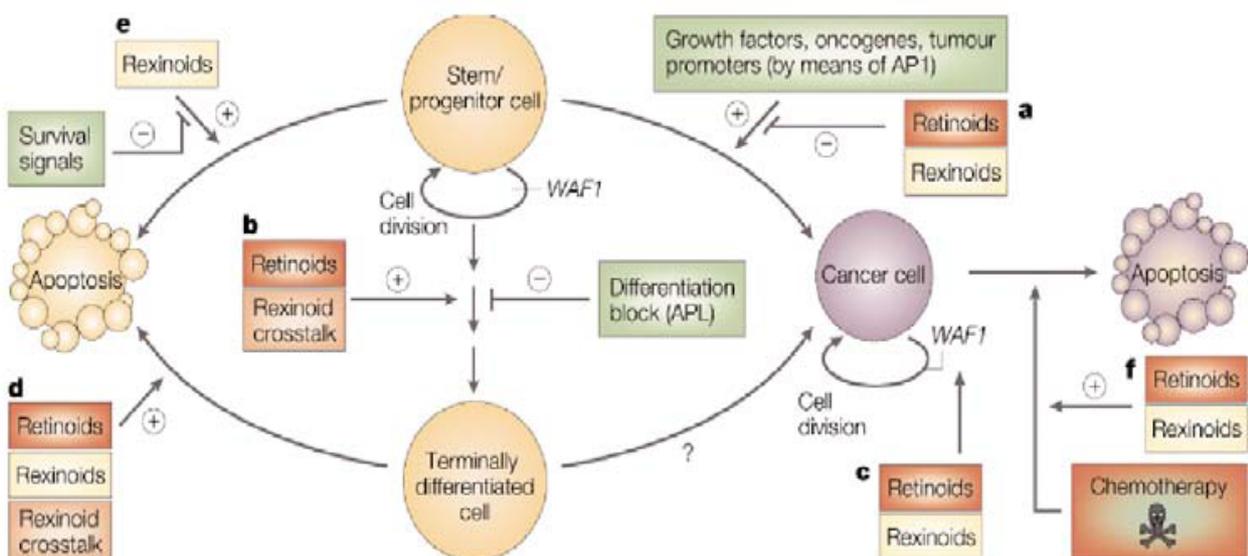


Fig.2

BIOMATERIALI

Oggi sono disponibili materiali che vengono utilizzati in applicazioni dentali ed ortopediche come sostituenti del tessuto osseo o come rivestimento di impianti metallici (14), in grado di facilitare l'adesione e la duplicazione cellulare e la formazione di matrice sulla superficie degli impianti stessi (15). Un esempio sono i Bioglass®, 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. Il Bioglass chimicamente è una ceramica vetrosa composta da:

- Biossido di silicio (45%)
- Ossido di Sodio (24,5%)
- Ossido di Calcio (24,5%)
- Pentossido di Fosforo (6%)

Tale biovetro fu sviluppato per soddisfare problematiche di impiantistica ossea, in quanto sulla superficie dei biovetri avvengono una serie di reazioni chimiche con formazione di uno strato di apatite idrossi-carbonato che favorisce la neoformazione di matrice ossea.

Da allora sono stati ampiamente studiati per applicazioni cliniche di molti altri materiali e vetri ceramici con composizione chimica simile (16). Il recente avvento di particolari tecniche di sintesi dei materiali 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.

Tra le tante è stata studiata la parziale sostituzione del sodio con zinco nei vetri bioattivi per stimolare la proliferazione e la differenziazione cellulare (17): 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 (18). Lo zinco è un cofattore per molti enzimi, ed un segnale intracellulare esso stesso, stimola la sintesi proteica ed è un metallo

fondamentale per la replicazione del DNA (19). Inoltre dal punto di vista strettamente chimico-fisico prolunga la durezza dei materiali ritardandone la dissoluzione e le reazioni in ambiente acquoso (come nei liquidi biologici) incrementando le proprietà meccaniche dei materiali stessi (20).

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 (21). 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

Chimicamente lo ione Zn²⁺ presenta due comuni geometrie di coordinazione nelle specie ossigenate, tetraedrica ed ottaedrica. Da recenti studi condotti su questi materiali si è osservato che aumentando lo Zinco totale (ZnO) al biomateriale iniziale di Hench, si ha una diminuzione della concentrazione di zinco in forma tetraedrica a vantaggio di quella ottaedrica, che finisce con il conferire ai materiali caratteristiche di impaccamento sempre più consistenti a seconda della concentrazione dello zinco stesso (21). Le analisi dei modelli atomici hanno mostrato che lo zinco, essendo molto impaccato nella rete strutturale dei materiali, non viene di fatto rilasciato in soluzione, nei tempi normalmente utilizzati in esperimenti di adesione e proliferazione cellulare (22). Il rilascio di Zinco si osserva invece su tempi molto più lunghi in funzione della concentrazione di zinco nel materiale, divenendo, in questo caso

direttamente, un potenziale determinante delle fenomenologie biologiche osservate in interazione con i materiali suddetti (23-24-25).

INTERAZIONE BIOMATERIALE - LIQUIDO BIOLOGICO

Dobbiamo considerare che quando parliamo di adesione di cellule su biomateriali non si intende un'adesione diretta della cellula sulla superficie del materiale, ma di adesione mediata da profili di adesione proteica.

E' noto infatti che i materiali in ambiente biologico sono soggetti ad interazione adesiva diretta con le proteine mobili proprie dell'ambiente stesso (sangue, liquido interstiziale). Le stesse sono inoltre soggette, in fase di adesione, a fenomenologie dinamiche tempo dipendenti, che interessano la loro struttura, quantità, qualità, funzione biologica.

Il comportamento delle proteine sulla superficie gioca un ruolo cruciale nel determinare la natura dell'interfaccia nei confronti delle cellule in adesione e possono influenzare anche le proprietà e la degradazione della superficie stessa del biomateriale.

La cellula in realtà interagisce con la copertura proteica e non con la superficie propria del biomateriale. Pertanto le differenti modifiche di interazione che il materiale induce sulle proteine in diretta adesione diventa pertanto l'effettivo fattore inducente e dispiegante il comportamento cellulare.

SCOPO DEL LAVORO

Il primo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il grado di adesione e proliferazione delle cellule di linea di neuroblastoma SKNBE e di quelle differenziate con Acido Retinoico (R.A.) a contatto con vetri bioattivi di Hench, dopo aver valutato il livello di adsorbimento proteico alle superfici dei diversi materiali utilizzati.

Scopo del lavoro è stato anche quello di studiare l'espressione di alcuni marker neuronali (Neurofilamento-L, Gap-43 e β -III Tubulina) delle due tipologie cellulari adese ai biovetri, per verificare l'interazione di questi materiali definiti bioattivi sulla maturazione del fenotipo differenziato indotto da R.A..

Successivamente si è pensato di verificare se questi biomateriali potessero indurre processi apoptotici nelle cellule andando a valutare sia l'espressione della caspasi-3 e della caspasi-9 nelle cellule staccate dai materiali, sia l'espressione di Akt e pAkt (quali segnali di sopravvivenza) nelle cellule adese. Sulle cellule staccate dai biovetri sono state fatte anche analisi per valutare se siano interessate vie di morte necrotica.

Sono stati utilizzati sia i biovetri privi di zinco (H) sia i biovetri contenenti diverse concentrazioni di zinco (HZ5, HZ10 e HZ20) al fine di determinare un'eventuale relazione tra l'indice di adesione-crescita cellulare ed il contenuto di zinco nei materiali stessi.

Sono tuttora in corso studi per verificare se una diversa espressione (qualitativa e quantitativa) di integrine di membrana possa aiutare la comprensione delle differenze osservate fino ad ora.

Scopo del lavoro futuro sarà valutare inoltre se tutti i dati ottenuti possano subire delle modificazioni nel caso in cui le due tipologie cellulari venissero messe a contatto con superfici rivestite con laminina, collagene o fibronectina, sostanze che da letteratura sembrano favorire l'adesione, la proliferazione e l'elongazione neuritica nelle cellule da noi trattate. In ultimo si valuterà se le stesse cellule siano in grado di

produrre matrice extracellulare ed eventualmente come questa possa influenzare il comportamento cellulare.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI E MATERIALI DI HENCH

Nello studio sperimentale dei biomateriali l'interazione cellulare ha il suo primo rilievo nei profili di adesione e di proliferazione. Il primo parametro misura l'interazione diretta della cellula sul biomateriale e fornisce informazione sulle proprietà biologiche del materiale stesso. Si ottiene misurando quante cellule rimangono adese a tempi prestabiliti al substrato in analisi. La proliferazione misura invece la presenza di condizioni di tossicità (più facilmente rilevabili nei limiti che la proliferazione cellulare si pone), quindi la capacità delle cellule di trovare sul materiale un ambito più o meno favorente il proprio sviluppo biologico. Da un punto di vista tecnico lo studio della proliferazione cellulare si misura in tempi più lunghi e si compone sia del numero di cellule che inizialmente seminate hanno sviluppato adesione, sia del numero di neocellule che a seguito di proliferazione hanno saputo sviluppare adesione.

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

Queste cellule sono state trattate con all-trans-retinoic acid (RA, Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA) 10µM 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 precedentemente riscontrato, con un tale tempo, un livello di differenziamento e di integrità cellulare ottimale per i propositi del presente lavoro.

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 anche nel presente lavoro come controllo (26).

Per ciascun materiale è stato valutato il profilo di adesione proteica sviluppatosi entro 1 ora, tempo che precede il primo realizzarsi dell'adesione cellulare (elettroforesi e silver staining).

Per ciascuna condizione sperimentale siamo andati a valutare: vitalità cellulare delle cellule sui materiali (MTT test), morfologia delle cellule (Arancio di Acridina), espressione di marker neuronali e fattori apoptotici (Western Blot).

ADSORBIMENTO PROTEICO

L'adsorbimento definisce il processo attraverso il quale eventuali molecole "aderiscono" ad una superficie solida.

Per determinare l'adsorbimento è stata prima calcolata l'area totale dei materiali da testare con il programma di analisi di immagine (Leica Qwin), successivamente è stato centrifugato il siero e prelevato il surnatante. Dopo aver diluito in acqua deionizzata il surnatante in rapporto 1:4, è stata scelta una quantità di liquido da utilizzare che andasse a sommergere l'intero materiale (nel nostro caso 200 µl/cm² a goccia) ed è stata aggiunta ai materiali in incubatore. Sono stati valutati i livelli di adsorbimento proteico dopo 1, 3 e 6 ore di incubazione. Dopo aver aspirato il liquido e lavato con

PBS, i materiali sono stati trattati con SDS bollente (100µl per superficie circa) al fine di staccare le proteine adsorbite, le proteine successivamente evidenziate tramite elettroforesi e silver staining ed analizzate qualitativamente e quantitativamente.

Il silver staining consiste nell'evidenziare in modo aspecifico, tramite precipitazione di sali d'argento, le bande proteiche ottenute con corsa elettroforetica. Queste sono state analizzate nella loro identità qualitativa tramite scale graduate di pesi molecolari.

L'aspetto quantitativo delle proteine evidenziate è stato determinato tramite analisi densitometrica semiquantitativa (cioè analisi di variazione di riferimento al controllo), delle bande evidenziate.

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 assumendo color viola-porpora a seconda della vitalità cellulare. Più le cellule sono vitali più la soluzione di DMSO appare colorata. Successivamente è stata fatta una lettura spettrofotometrica a 590 nm dei campioni ottenuti. I dati ottenuti sono stati normalizzati tramite una curva di taratura sperimentale.

Per singolo gruppo sperimentale i valori sono stati riportati come media ± Errore Standard della Media ed evidenziati nei grafici riportati. L'analisi statistica è stata condotta con test della varianza (ANOVA), con livello di significatività posto a $p < 0.05$.

ARANCIO DI ACRIDINA

Per visualizzare la morfologia delle cellule adese sulla superficie dei materiali, microscopicamente non regolarmente liscia, abbiamo utilizzato una colorazione fluorescente utilizzando l'arancio di acridina.

L'arancio di acridina è un colorante-intercalante specifico per la distinzione cromatica di DNA e RNA.

Intercalandosi al primo emette fluorescenza di lunghezza d'onda pari a 525 nm, cioè di colore giallo-verde (indicando attività metabolica), mentre per l'RNA si parla di 650 nm, cioè luce rossa-arancione (indicando uno stato cellulare quiescente).

Ai tempi sperimentali 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 quindi osservate al microscopio a fluorescenza.

WESTERN BLOT

E' stata valutata, tramite western blot, l'espressione di proteine riconosciute come marker di controllo della maturazione morfologico-funzionale dei prolungamenti (simil neuronali) delle cellule in studio. 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).

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 ed ai materiali in esame.

Sono stati caricati 10 •g 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.).

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 e su quelli ottenuti dalle cellule adese. Inoltre è stata valutata anche l'espressione di proteine quali Akt (rabbit Akt antibody, Chelbio) e pAkt (Rabbit PhosphoAkt, Chelbio) come espressione della sopravvivenza cellulare sui biovetri.

TRYPAN BLUE

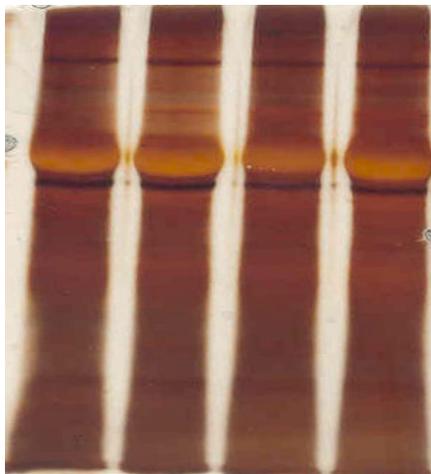
Le cellule staccate dai materiali sono state prelevate assieme al terreno di coltura e su di esse è stato fatto il test del Trypan Blue 0,4%. Tale test evidenzia le cellule danneggiate, in quanto la colorazione blu permea attraverso le membrane cellulari. Nel caso in cui ci fosse morte cellulare di tipo necrotico (quindi con lisi della membrana cellulare, condizione che non si verifica in caso di morte apoptotica), le cellule appaiono come strutture tondeggianti blu se osservate al microscopio. Per questo esperimento le

cellule sono state sospese nella soluzione di Trypan Blu e successivamente contate al microscopio attraverso l'utilizzo di camera di burker.

RISULTATI

ADSORBIMENTO PROTEICO

Nell'analisi delle proteine adsorbite ai materiali abbiamo osservato che questi dopo 1, 3 e 6 ore sono colonizzati dall'albumina, che si presenta come la proteina che maggiormente riveste la superficie del materiale. Le diverse composizioni in zinco non influenzano né la natura dell'adesione proteica, né la quantità della stessa (Fig.3). E' stato osservato che la quantità di proteine adsorbite dopo un'ora è equivalente alla quantità di proteine adsorbite ai materiali nei tempi successivi.



Albumina 69 KDa

H HZ5 HZ10 HZ20

Fig. 3. Silver staining dell'adsorbimento proteico ai materiali dopo un'ora.

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.4-Fig.5). 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, in

tutti i materiali dopati con zinco abbiamo osservato un numero di cellule adese statisticamente superiore rispetto al vetro di Hench senza zinco (H) (Fig.4).

Dopo tre ore di incubazione invece osserviamo una diminuzione del numero di cellule in adesione, proporzionalmente più evidente con l'aumento della concentrazione di zinco.

Un simile andamento non si osserva su H dove il numero delle cellule adese rimane costante tra 1 e 3 ore. Il trend di riduzione del numero di cellule adese continua a riproporsi anche dopo sei ore di incubazione su tutti i materiali testati, raggiungendo livelli simili nei vari materiali, con l'eccezione di HZ20 dove tale riduzione si fa statisticamente più evidente (Fig.4).

Dopo 12 ore, ultimo intervallo di tempo valido per i profili di adesione, si osserva una notevole ripresa del numero di cellule adese su tutti i campioni considerati, con valori simili sui diversi materiali testati.

L'analisi dei profili di proliferazione (Fig.5), ci ha mostrato un numero di cellule adese inferiore del 50% rispetto alla quantità di cellule inizialmente seminate sui vari materiali, con un livello particolarmente basso sul materiale HZ20. Tra le 24 e le 48 ore il numero di cellule individuate appaiono influenzate dal contenuto di zinco dei materiali. Osserviamo un incremento del numero di cellule su H e HZ5, che rimane costante su HZ10 rispetto al numero contato a 24 ore, per mostrarsi significativamente ridotto su HZ20. Spingendo la nostra osservazione a 72 ore c'è il conservarsi del numero di cellule già individuato, che solo in HZ20 riveliamo ulteriormente ridotto (Fig.5).

Alle cellule adese ai materiali, 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 prolungarsi del tempo di adesione.

La morfologia evidenziata presenta un profilo cellulare che si caratterizza come liscio e circolare; la stessa non sembra variare nel tempo e nemmeno a seconda del materiale su cui le cellule vengono seminate. Le cellule SK-N-BE tendono a formare

piccoli aggregati tra loro, abbiamo notato, a seguito di osservazioni qualitative, una diminuzione apparentemente proporzionale nella densità distributiva e aggregatrice, con l'aumento della concentrazione di zinco; ad evidenziare una probabile influenza specifica della superficie sull'adesione cellulare.

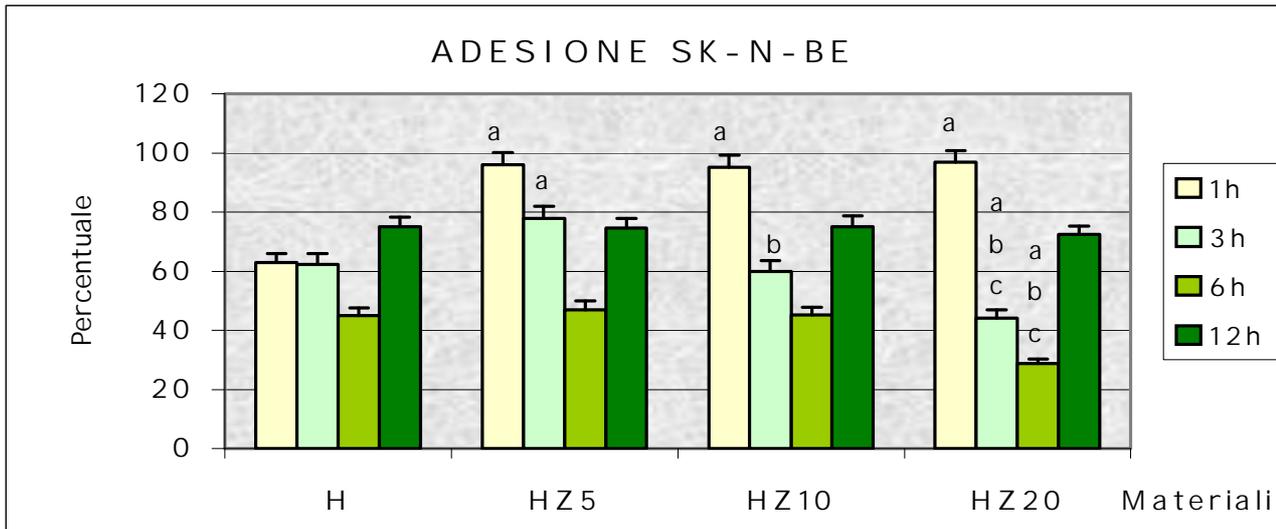


Fig. 4 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE in adesione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione.

Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di egual misura.

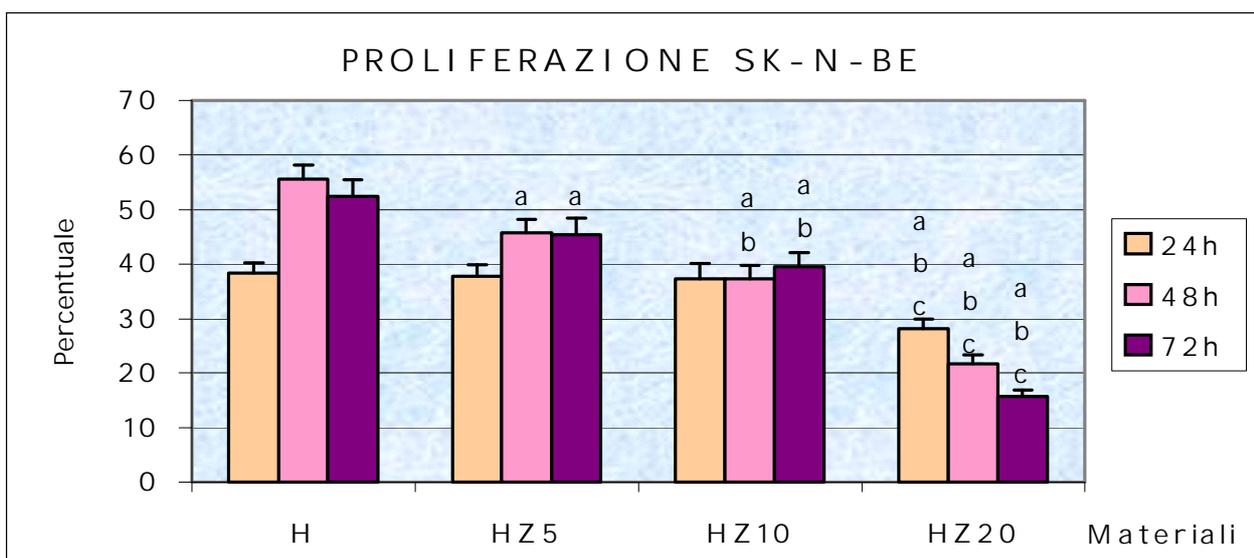


Fig. 5 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE in proliferazione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione.

Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di egual misura.

CELLULE SK-N-BE + R.A.

I dati ottenuti sulle cellule SK-N-BE trattate con Acido Retinoico per 10 giorni sono rappresentati in Fig.6 ed in Fig.7.

Come si può osservare dal grafico relativo all'adesione cellulare (Fig.6), la percentuale di cellule che già dopo un'ora di incubazione rimangono adese ai materiali è particolarmente elevata, con valori quasi prossimi al 80%, sia su H sia su tutti i materiali dopati con zinco. Nelle ore successive su H, HZ5 e HZ10 abbiamo osservato una diminuzione progressiva fino ad arrivare, dopo 12 ore di coltura, a valori poco più elevati del 40% rispetto alle iniziali cellule seminate.

Su HZ20 invece abbiamo osservato una adesione costante per le prime 3 ore, quindi differentemente da quanto osservato per gli altri materiali, abbiamo osservato un incremento a 6 ore seguito da una drastica diminuzione delle cellule adese a 12 ore, con livelli raggiunti simili a quelli riscontrabili sugli altri materiali (Fig. 6).

Per quanto riguarda i tempi di proliferazione (Fig.7), i dati ottenuti sono molto più eterogenei e di andamento contrario rispetto ai corrispondenti dati ottenuti con le SK-N-BE non trattate con Acido Retinoico. A 24 ore di incubazione abbiamo osservato una netta risposta positiva data dall'alta percentuale di cellule adese. Mentre nei tempi successivi su H si riscontra una progressiva riduzione del numero di cellule, sugli altri materiali abbiamo osservato un incremento proporzionale alla concentrazione di zinco tra le 24 e le 48 ore. Su HZ10 e HZ20, tenuto conto della spinta proliferativa, abbiamo registrato perfino un aumento del numero delle cellule superiore a quello inizialmente seminato. Dopo 72 ore di coltura però abbiamo registrato una drastica diminuzione del numero di cellule vitali, 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 ma tale colorazione non ha dimostrato particolari differenze rispetto alle SK-N-BE.

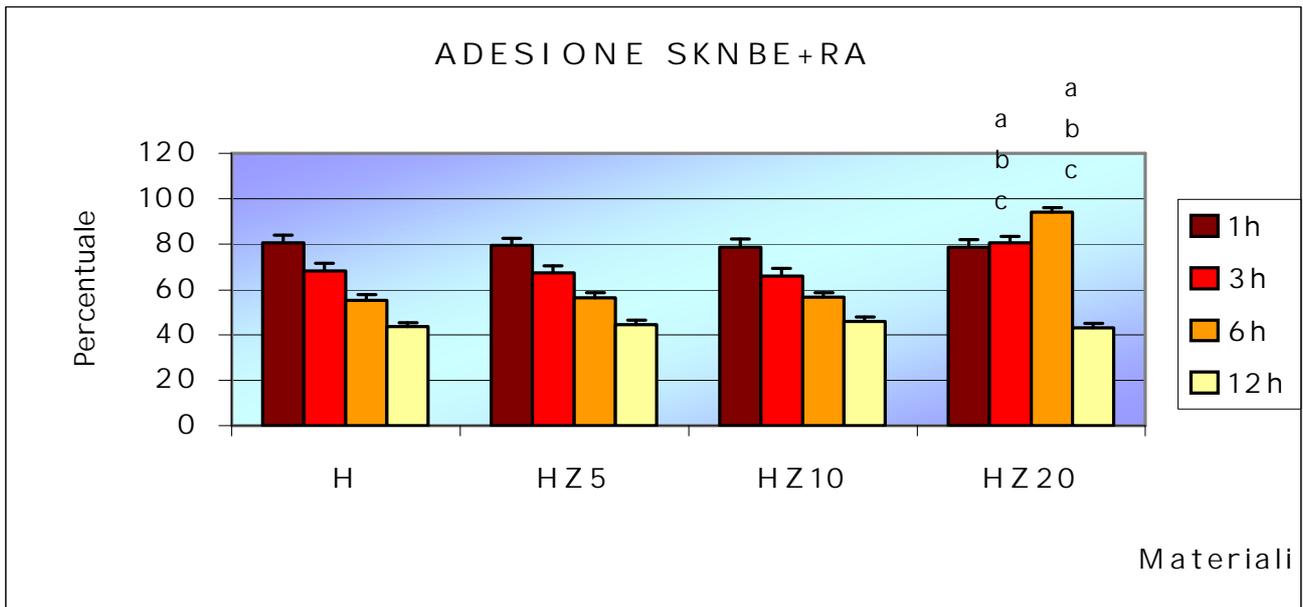


Fig. 6 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE + R.A in adesione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione. Significatività per $p < 0.05$.

a = vs.H b = vs.HZ5 c = vs.HZ10

La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di equal misura.

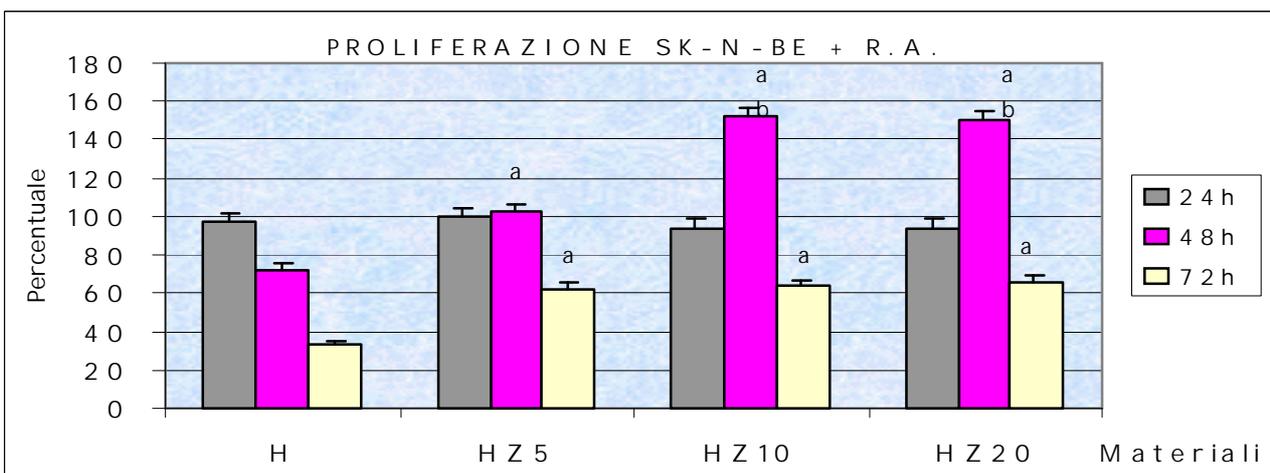


Fig. 7 :Istogramma a barre che mostra la percentuale di cellule SK-N-BE + R.A. in proliferazione sui diversi materiali a diverse ore di incubazione. Significatività per $p < 0.05$. a = vs.H b = vs.HZ5
c = vs.HZ10

La significatività all' interno di uno stesso gruppo è sempre significativa eccetto dove le barre appaiono di equal misura.

Come detto in precedenza scopo del lavoro è stato anche quello di studiare l'espressione di alcuni marker neuronali (quali il Neurofilamento-L, Gap-43 e •III Tubulina) delle due tipologie cellulari adese ai biovetri, per verificare l'interazione di questi materiali definiti bioattivi sulla maturazione del fenotipo differenziato indotto da R.A.. I risultati ottenuti sono i seguenti.

NEUROFILAMENTO (NF-L)

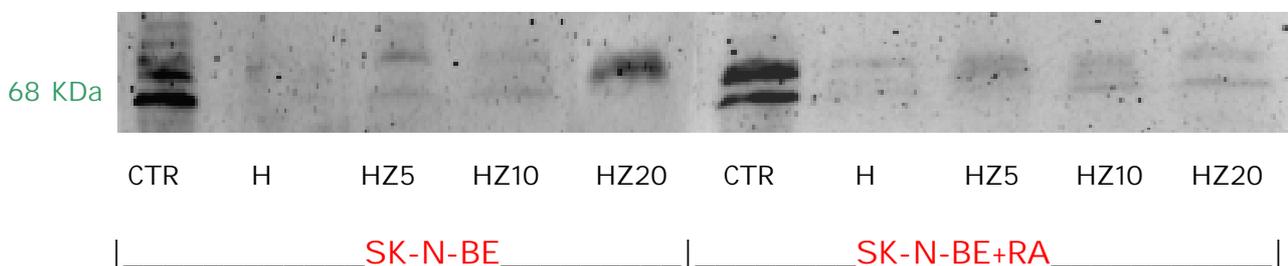


Fig.8. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti al Neurofilamento-L, M.W.=68 KDa.

Come si può osservare in Fig.8, Western Blot hanno evidenziato la presenza di bande relative al Neurofilamento-L (M.W.=68 KDa) nettamente evidenti in corrispondenza dei controlli su plastica, sia per le SKNBE sia per SKNBE+RA. I lisati delle cellule adese ai materiali hanno invece evidenziato bande meno marcate soprattutto per quanto riguarda le cellule di neuroblastoma non trattate con acido retinoico, ad eccezione che su HZ20.

GAP-43

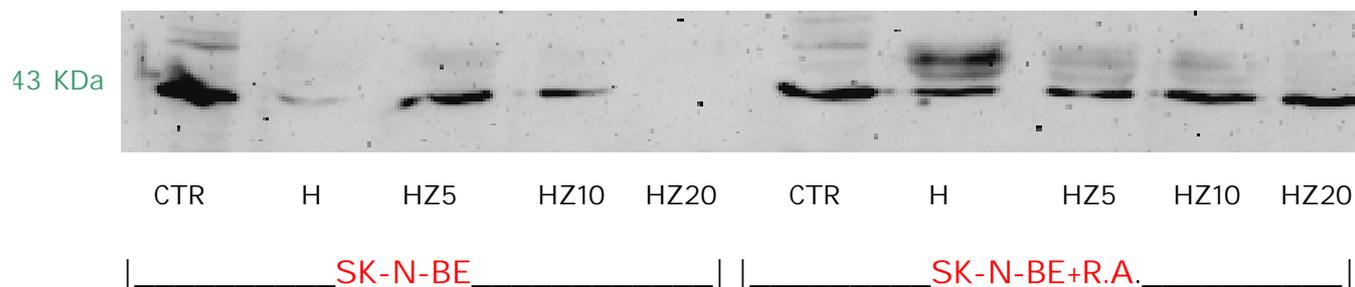


Fig.9. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti al Gap-43, M.W.= 43 KDa.

Come si osserva in questa immagine di Western Blot, Gap-43, proteina che risiede alla base del cono di elongazione del neurite, è altamente espressa nelle cellule adese alla plastica di controllo, specialmente per quanto concerne le cellule SKNBE+RA. Questa tipologia cellulare esprime livelli evidenti di questa proteina anche in adesione sui materiali, espressione meno accentuata invece nelle SKNBE in adesione sui biovetri. Dato questo che conforta il nostro studio perché ci dimostra che le SKNBE trattate con acido retinoico a contatto con i vetri di Hench non subiscono delle limitazioni al differenziamento verso il fenotipo neuronale.

•III TUBULINA

I risultati ottenuti da Western Blot per questa proteina non hanno dato risultati positivi sui lisati cellulari di SKNBE adese ai diversi materiali considerati, mentre i lisati delle cellule trattate con acido retinoico hanno evidenziato delle bande molto poco significative in corrispondenza della •III Tubulina. Siamo in attesa di compiere un nuovo esperimento per evidenziare una maggiore discriminazione tra le due diverse tipologie cellulari a contatto con i biovetri.

Western blot sono stati eseguiti anche per valutare la presenza di marker apoptotici, quali la Caspasi-3, la Caspasi-8 e la Caspasi-9 nelle loro forme attivate, sia sulle cellule adese ai materiali sia su quelle distaccate, in entrambe le tipologie cellulari.

CASPASI 3

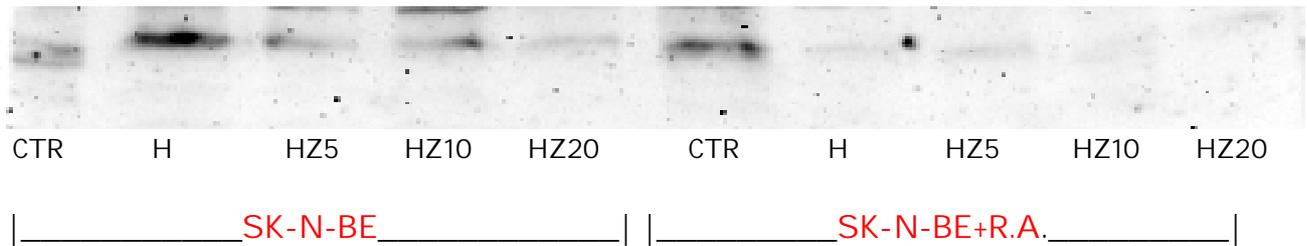


Fig.10. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti alla Pro-Cas3, M.W.=32KDa.

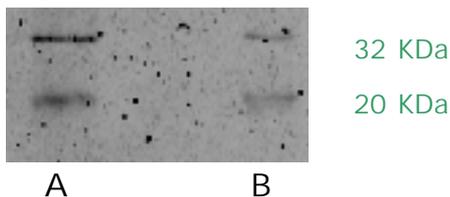


Fig.11. Western blot di lisati cellulari di SKNBE+RA (A) e di SKNBE (B) staccate dai materiali. Bande corrispondenti alla Pro-Cas3, M.W.=32KDa, ed alla forma attiva di Cas-3, M.W.=20KDa.

Come si può osservare dalla Fig.10 sono state riscontrate delle bande di positività alla proforma della Caspasi-3 soprattutto nelle SKNBE adese ad H, rispetto alle stesse cellule su materiali a concentrazione maggiore di zinco. Le SKNBE+RA invece hanno dato segnali molto meno evidenti e significativamente inferiori al segnale dato dalle stesse cellule sulla plastica di controllo. In nessun caso si sono rintracciati segnali della Caspasi-3 nella sua forma attivata (20KDa).

Come si osserva in Fig.11 invece, le SKNBE+RA staccate dai materiali hanno evidenziato nettamente la presenza di Cas-3 sia nella sua proforma (32KDa) sia nella sua forma attiva (20KDa); segnali presenti ma significativamente molto inferiori per quanto riguarda le SKNBE.

CASPASI 8

Western blot sono stati eseguiti sui lisati di SKNBE ed SKNBE+RA, sia adese sia staccate dai materiali, per evidenziare la presenza di Caspasi-8 ma in entrambi i casi i risultati sono stati negativi. Le cellule non esprimono Caspasi-8 nemmeno nella proforma.

CASPASI 9

I risultati dei Western blot hanno messo in evidenza (Fig.12) un segnale alquanto limitato per quanto concerne la proforma della Caspasi-9 (50KDa) nelle SKNBE e nelle SKNBE+RA adese ai materiali. Assente un segnale di positività alla Caspasi-9 nella sua forma attivata.

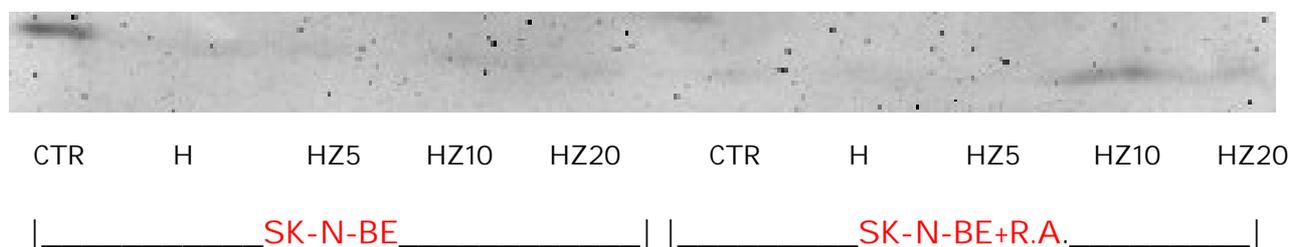


Fig.12. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali dopo 24 h di adesione. Bande corrispondenti alla Pro-Cas9, M.W=50KDa.

Per quanto riguarda le cellule staccate dai materiali, le SKNBE+RA hanno evidenziato positività per la proforma della Cas-9 ed anche un leggero segnale per la forma attiva. Significativamente inferiori i risultati ottenuti sulle SKNBE (Fig.13).

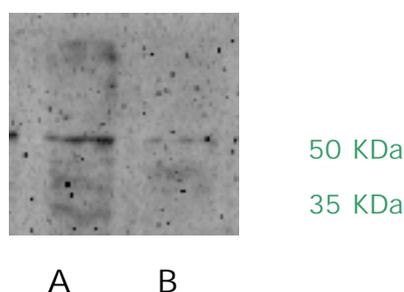


Fig.13. Western blot di lisati cellulari di SKNBE+RA (A) e di SKNBE (B) staccate dai materiali. Bande corrispondenti alla Pro-Cas9, M.W=50KDa, ed alla forma attiva di Cas-9, M.W.=35KDa.

Dopo aver ottenuto i risultati mostrati in precedenza riguardo all'espressione dei marker apoptotici, passo successivo è stato quello di valutare se le cellule che si staccassero dai materiali risultassero positive al test del Trypan Blue, al fine di osservare se tale distacco fosse correlato ad un tipo di morte necrotica.

La conta al microscopio delle cellule di colore blu, e quindi con lisi della membrana cellulare, ha portato ai seguenti risultati. Meno del 10% delle cellule SKNBE staccate dai materiali ha dato segnale positivo al test del Tripan Blue, in particolare segnali molto bassi si sono riscontrati sulle cellule staccate da H e da HZ5, leggermente più alti i valori ottenuti nelle SKNBE staccate da HZ10 ed HZ20. Per ciò che riguarda le cellule trattate con acido retinoico invece abbiamo ottenuto risultati differenti, con una percentuale di cellule in fase necrotica pari a circa al 25% rispetto al totale delle SKNBE+RA staccate dai materiali. In questo caso la percentuale delle cellule necrotiche è risultata essere praticamente equivalente su H, HZ5 ed HZ10 mentre su HZ20 si è riscontrato che praticamente la metà delle cellule staccate dal materiale era in fase necrotica.

I dati mostrati fino ad ora hanno portato poi l'attenzione sulla ricerca di qualcosa che potesse verificare il "tentativo" delle cellule adese ai materiali di sopravvivere. L'analisi delle caspasi nelle cellule adese ai materiali hanno messo in evidenza una maggiore presenza di caspasi-3 rispetto alle altre investigate (cas-8 e cas-9), caspasi che comunque potrebbe anche essere coinvolta in processi proliferativi e non necessariamente in quelli apoptotici. Da qui la ricerca della presenza di Akt, proteina legata alla sopravvivenza cellulare. I risultati ottenuti sono mostrati in Fig.14

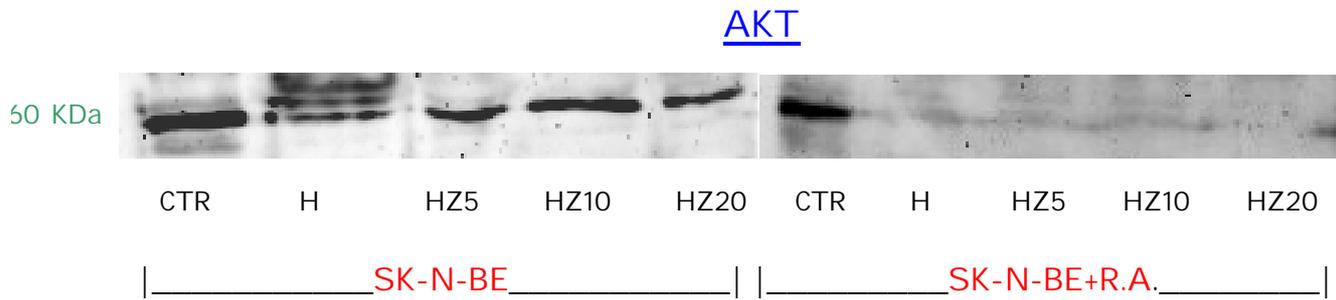


Fig.14. Western blot di lisati cellulari di SKNBE e di SKNBE+RA adese ai materiali. Bande corrispondenti ad Akt, M.W.= 60 KDa.

Come si può osservare da questa immagine i risultati ottenuti dalla ricerca di questa proteina sono alquanto contrastanti tra le SKNBE e le SKNBE+RA. Le cellule di neuroblastoma hanno evidenziato bande molto accentuate di Akt, sia sul controllo, sia in seguito a semina sui materiali. Quelle differenziate invece hanno mostrato tendenza alla sopravvivenza su CTR ma risultati molto più modesti si sono ottenuti ricercando Akt sui lisati cellulari di SKNBE+RA sui biovetri.

Tale dato può comunque trovare il suo riscontro se si considera che le SKNBE sono cellule di neuroblastoma, cellule tumorali, e come tali tendono sempre a trovare un ambiente favorevole entro cui crescere e proliferare; cosa che non accade quando queste vengono differenziate verso il fenotipo neuronale.

Sono ancora in corso lavori per verificare l'espressione di pAkt in entrambe le tipologie cellulari.

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. 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, meno presenti negli altri materiali dove lo ione zinco, sotto forma di Zn^{2-} (ZnO_4)²⁻, oltre a rendere la struttura più compatta, immobilizza e bilancia la carica degli ioni Na^+ . Questo fatto ha la sua importanza considerando che le cellule prediligono per l'adesione ambienti con prevalenza di cariche negative, mentre gioca a sfavore la presenza di cariche positive. Fattore non trascurabile per le fenomenologie di adesione cellulare è la caratteristica liscia/ rugosa della superficie. Da analisi condotte su diversi modelli sperimentali si è notato che superfici rugose (rugosità micro-strutturata) meglio dispongono le cellule all'adesione. L'analisi di superficie dei biovetri zincati ha evidenziato che l'aumento della concentrazione di zinco favorisce la microstrutturazione della rugosità di superficie (23).

L'interazione delle proteine dell'ambiente biologico è un fattore che precede ed influenza grandemente l'adesione cellulare. Abbiamo osservato che tale reazione su tutti i materiali testati dava luogo al medesimo quadro adesivo che vede coinvolta l'albumina con livelli quantitativi comparabili tra i diversi materiali.

L'uso delle tecniche di indagine fin qui adottate non ci consente di verificare direttamente se i diversi materiali impongono all'albumina un diverso e specifico cambio conformazionale che identifica caratteristiche specifiche di superficie. Comunque i risultati eterogenei di adesione cellulare osservati nel presente lavoro ci dispongono a cercare anche in tale fenomenologia una possibile spiegazione di quanto osservato.

SK-N-BE NON TRATTATE CON ACIDO RETINOICO

Noi pensiamo che l'elevata percentuale di cellule SK-N-BE adese ai materiali osservata 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 legami specifici che presuppongono adeguamenti intracitoplasmatici, pertanto presupponiamo che i legami coinvolti siano esclusivamente di natura chimica. Inoltre il fatto che le SK-N-BE adese al vetro di Hench originale (H) siano, dopo un'ora, in percentuale inferiori a quelle adese sugli altri materiali, dà sostegno all'ipotesi che su H la presenza di ioni Na^+ liberi (non coordinate) disturbino la fase iniziale dell'adesione cellulare. Quindi i materiali dopati con zinco offrono, con la diminuita presenza di cariche positive libere, una condizione più favorevole all'adesione cellulare.

La susseguente diminuzione rapida e generalizzata delle cellule adese dopo tre e sei ore di incubazione, a nostro parere, potrebbe invece trovare spiegazione nel subentrare di vie metaboliche, che coinvolgono la ricerca di substrati specifici stabilizzanti la sopravvivenza cellulare. Di conseguenza l'assenza di tali substrati specifici portano le cellule al distacco. Di fatto abbiamo osservato come la diversa percentuale di zinco contenuta nei materiali non rappresenta un fattore determinante per questo comportamento cellulare, che in effetti si riscontra costante su tutti i materiali testati nel nostro studio.

Sorprendentemente dopo 12 ore di coltura si è osservato invece un incremento del numero di cellule in adesione, su tutti i materiali. Con i risultati sperimentali in nostro possesso, non sappiamo se questo fenomeno ha alla sua base una ripresa dell'importanza di interazioni aspecifiche o piuttosto l'acquisizione di nuove forme di adesione non presenti o non operanti a 3 e 6 ore di adesione.

Comunque osservazioni di altri autori (24-25) hanno evidenziato 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

(quali la vinculina) ampiamente espresse, in modo proporzionale alla concentrazione di zinco nei materiali.

Comunque di nuovo su tutti i materiali si riscontrata una drastica diminuzione di cellule a 24 ore, quando i processi proliferativi dovrebbero iniziare a prendere campo sui processi adesivi stessi.

Il dato da noi rivelato potrebbe trovare spiegazione nel fatto che le cellule, per potersi duplicare, necessitano di definire una labilizzazione dei contatti adesivi. Di conseguenza in una situazione adesiva non ottimale, gli eventi di proliferazione trovano ulteriori difficoltà nello stabilizzare l'adesione cellulare.

Le cellule rimaste adese ai materiali vanno comunque incontro al progredire dei processi proliferativi sui biovetri su H e HZ5, dove si riscontra un aumento di cellule dopo 48 ore. Evidenziando che su questi materiali le SK-N-BE troverebbero condizioni proliferative accettabili, a differenza di quanto succede su HZ10 e HZ20 dove la proliferazione è limitata (HZ10) o addirittura sfavorita (HZ20). Questa osservazione indicherebbe che più alte concentrazioni di zinco, e quindi di impaccamento della struttura, rappresenti in sé un fattore sfavorevole alla proliferazione cellulare.

Dobbiamo tener conto del fatto che in queste cellule lo stato non differenziato definisce una espressione di integrine meno specifiche per l'adesione cellulare. Si potrebbe ipotizzare la presenza in membrana di fattori di adesione aspecifici che su lungo tempo non favoriscono i processi di adesione cellulare

SK-N-BE TRATTATE CON ACIDO RETINOICO

Le analisi di Western Blot hanno evidenziato che entrambe le tipologie cellulari da noi considerate esprimono, su un substrato di controllo (superficie delle piastre da coltura), le proteine β III-tubulina, GAP-43 e Neurofilamento, considerate tra i markers fondamentali del fenotipo neuronale. Questo ci indica che la differenziazione ottenuta con acido retinoico non indurrebbe cambi sostanziali nelle proteine cellulari di tipo strutturale.

Queste cellule, come precedentemente descritto, presentano un'espressione più ampia e diversificata delle integrine di membrana, che vedono un'ampia espressione della subunità $\alpha 1$ a fornire dimeri specifici per l'adesione a proteine di matrice extracellulare quali il fibronectina, laminina o collagene.

Anche nelle cellule SKNBE trattate con acido retinoico si osserva una elevata percentuale di cellule adese ai materiali dopo un'ora di incubazione. Di nuovo, il dato potrebbe trovare spiegazione in un' interazione di carica tra cellule e substrato. Dove il più alto numero di cellule in adesione osservato rispetto alle SKNBE non trattate potrebbe trovare supporto nella più ampia espressione di integrine, capaci di fornire anche un maggiore numero di siti aspecifici di interazione.

Quindi nei successivi tempi di adesione (3, 6, 12 ore) si osserva una proporzionale riduzione del numero di cellule adese. Questo dato potrebbe essere coerente con l'impossibilità da parte delle integrine di trovare substrati di legame specifico che giustificano la stabilizzazione delle cellule in adesione portando ad un progressivo distacco delle cellule.

Apparentemente discordante con le ipotesi sopra avanzate sono invece le osservazioni ottenute su biovetri HZ20, dove è invece un aumento delle cellule adese il fenomeno rilevante soprattutto dopo 6 ore. Poiché come si è sopra ricordato lo strato di adesione proteica è costante qualitativamente (albumina) e quantitativamente, la spiegazione va di nuovo cercata nelle condizioni intrinseche generate dalla struttura dei materiali. L'elevato impaccamento e immobilizzazione delle cariche positive (Na^+) dovrebbe fornire la spiegazione al fenomeno, che comunque evolve dopo 12 ore di adesione nelle stesse condizioni di quanto già osservato con gli altri materiali. Analizzando i profili di proliferazione (numero di cellule adese tra 24 e 72 ore) abbiamo per H la ripetizione di profili già osservati in adesione; la presenza di zinco favorisce la numerosità cellulare entro le 48 ore seguita da una brusca riduzione apprezzabile a dopo 72 ore.

Da qui ipotizziamo che le condizioni offerte dai materiali dopati con zinco offrano alle integrine (nella misura in cui queste definiscano la reale differenza all'interazione adesiva sui biomateriali nel caso delle cellule SKNBE-RA) una capacità di interazione aspecifica più stabile, comunque imperfetta come dimostrerebbe l'evoluzione verso il distacco cellulare nei tempi più lunghi.

Sono stati condotti studi per determinare se le cellule che si staccano dai materiali vanno incontro a morte apoptotica. I Western Blot fatti sui lisati cellulari ottenuti da cellule adese ai materiali e cellule distaccatesi presenti nei terreni di coltura hanno dato risultato negativo all'attivazione della caspasi -8 e -9. Questi risultati metterebbero in evidenza che le cellule che si staccano dai materiali non lo fanno conseguentemente all'occorrenza di processi apoptotici, ma il loro distacco sarebbe quindi solo condizionato dalle dinamiche di interazione relative alla stabilizzazione dell'adesione cellulare. Stiamo ancora valutando i processi legati alla morte cellulare, unitamente ai risultati ottenuti dall'analisi delle caspasi e ai risultati del Trypan Blue. Non siamo in grado ad oggi di dare una corretta giustificazione ai segnali di positività ottenuti per la caspasi-3; questa potrebbe essere legata a processi apoptotici così come potrebbe essere la Caspasi-3 coinvolta nei sistemi proliferativi. Ci prefiggiamo di arrivare ad una corretta conclusione con i risultati dei test ancora in corso.

Sono infatti in corso approfondimenti relativi allo studio delle vie metaboliche intracellulari potenzialmente coinvolte nei processi di stabilizzazione/destabilizzazione dell'adesione cellulare.

Contiamo di giustificare invece i dati ottenuti dai Western Blot relativamente ai marker neuronali unendo tali dati a quelli che otterremo da analisi più approfondite delle integrine di membrana. Nostro intento è infatti quello di trovare un filo conduttore che giustifichi sia l'andamento di adesione/proliferazione, sia la struttura morfologico funzionale delle due tipologie cellulari considerate in questo lavoro.

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

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

L'espressione di integrine di adesione, quale è noto verificarsi nelle cellule differenziate, diventa un fattore dominante nel comportamento adesivo delle cellule su di una superficie, che tiene conto del rifiuto all'adesione sicuramente su tempi lunghi (72 ore). Le stesse integrine sembrerebbero coinvolte non solo nella fase tardiva dell'adesione in cui gli eventi intracellulari stabilizzano la condizione adesiva della cellula, ma anche in una fase iniziale presupponibile come aspecifica conferendo nell'insieme una determinante ampia al fenomeno adesivo stesso.

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, Tiberio R, Piffanelli V, Santoro C, Cannas M., Activation of caspase-8 triggers anoikis in human neuroblastoma cells, *Neurosci Res.* 2006 Oct;56(2):145-53. Epub 2006 Jul 25.
4. Bozzo C, Lombardi G, Santoro C, Canonico PL, Involvement of beta(1) integrin in betaAP-induced apoptosis in human neuroblastoma cells, *Mol Cell Neurosci.* 2004 Jan;25(1):1-8.
5. Bozzo C, Bellomo G, Silengo L, Tarone G, Altruda F, Soluble integrin ligands and growth factors independently rescue neuroblastoma cells from apoptosis under nonadherent conditions, *Exp Cell Res.* 1997 Dec 15;237(2):326-37.
6. Bozzo C, Defilippi P, Silengo L, Tarone G, Role of tyrosine phosphorylation in matrix-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma cells, *Exp Cell Res.* 1994 Sep;214(1):313-22.
7. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J.*, 5: 2924-2933, 1991.
8. 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.
9. Mangelsdorf D. J., and Evans R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83: 841-850, 1995.
10. 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.
11. Aranda A, Pascual A 2001 Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81:1269-1304.

12. 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
13. 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
14. T. Kokubo, H.M. Kim and M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials* 24 (2003), pp. 2161-2175.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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
19. 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.
20. 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
21. 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.
22. G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M.C. Menziani et al, Properties of zinc releasing surfaces for clinical applications, *Journal of biomaterials applications*, volume 00- 2007.

23. G. Lusvardi¹, G. Malavasi¹, L. Menabue¹, M.C. Menziani¹, A. Pedone¹, U. Segre¹, V. Aina², A. Perardi², C. Morterra², F. Boccafoschi, S. Gatti ³, M. Bosetti³ , M.Cannas³, Chemical properties of zinc releasing surfaces and related osteoblast-like cells behaviour, ¹University of Modena and Reggio Emilia, Modena, ITALY, ² Dept. of Chemistry IFM, University of Torino, ITALY, ³Dept of Clinical and Experimental Medicine, University of Eastern Piedmont, Novara, ITALY.

24. 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.

25. V. Salih, A. Patel, J.C. Knowles, Zinc-containing phosphate-based glasses for tissue engineering, 2007 Mar;2(1):11-20. Epub 2007 Jan 12.

SEMINARI SEGUITI DURANTE L'ANNO DI DOTTORATO:

4/10/2007- " Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica"- Prof. Fabio Marra, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze

20/12/2007- " Human papillomavirus loads and its correlation with non-melanoma skin cancer "- Dott. Soenke Weissenborn- Istituto di Virologia, Università di Colonia (Germania)

14/01/2008- "Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche" TENENTE DOTT. GIORGIO PORTERA, UFFICIALE BIOLOGO, CARABINIERI REPARTO, INVESTIGAZIONI SCIENTIFICHE (RIS), PARMA

21/01/2008- " K⁺ channels in the heart: in and out of control", DR. SUSANNE RADICKE PH.D, INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY, DRESDEN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY DRESDEN - GERMANY

23/01/2008- 'Integrin trafficking and tumour cell invasiveness', Dr Jim Norman - Integrin Cell Biology Lab, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow G61 1BD, Scotland, U.K.

24/01/2008- "La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni" Mario Raspanti, Professore Ordinario di Anatomia Umana, Università dell' Insubria -Varese

31/1/2008- " Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatica cronica "- Prof. Valter Gattei - Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio e per le Terapie Cellulari, Centro di Riferimento Oncologico, I.R.C.C.S, Aviano

6/02/2008- " Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo "DOTT. GIANLUCA DEBELLIS, CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE , ISTITUTO DI TECNOLOGIE BIOMEDICHE, SEGRATE

7/02/2008- " La proteina HMGB1 è un segnale di danno tissutale "- Prof. M. E. Bianchi- DIBIT, Università San Raffaele, Milano

21/02/2008- " New treatment strategies for multiple myeloma " Prof. A. Palumbo- Divisione Universitaria di Ematologia ,Università degli Studi di Torino, Azienda- Ospedaliero Universitaria S. Giovanni Battista Torino

27/02/2008 - " Il nerve growth factor controlla la produzione di beta-amiloide. un collegamento contro il morbo di Alzheimer "- Prof. Pietro Calissano, Institute of Neurobiology and Molecular Medicine, CNR, Neuroscience Department, Faculty of Medicine, Tor Vergata University and European Brain Research Institute (EBRI), Roma, Italy

5/03/2008- "Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination"- Annalisa Macagno, PhD, Institute for research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland.

13/03/2008- "To repress gene expression just take out vinegar: role of the class II histone deacetylase HDAC4 " - PROF. CLAUDIO BRANCOLINI - DEPT. OF BIOMEDICAL SCIENCES AND TECHNOLOGIES, CENTER OF EXCELLENCE, UNIVERSITA' DI UDINE, ITALY.

13/03/2008- " Il sistema Ghrelin: aspetti endocrini e metabolici "- Prof. F. Broglio, Dipartimento di Medicina Interna, Prof. C. Gauna, Dipartimento di Anatomia, Farmacologia e Medicina Legale, Università di Torino

20/3/2008-" Immunologia della psoriasi "- Prof. Giampiero Girolomoni- Clinica Dermatologica, Università di Verona

2/04/2008- "p53 INVOLVEMENT IN ALZHEIMER'S DISEASE:HOW FIBROBLASTS MAY LINK NEURONS WITH LYMPHOCYTES"-Prof. M.Memo. Dept. Biomedical sciences & Biotechnologies University of Brescia, School of Medicine

3/04/2008- "Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile: un nuovo esempio di malattia da misfolding"- Prof. Fabrizio Barbetti- Professore Associato di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare - Università di Tor Vergata Roma - Laboratorio di Endocrinologia Molecolare e Metabolismo
Fondazione Parco Biomedico San Raffaele Roma

9/04/2008- "Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria "- Prof Gaetano Cairo
Istituto di Patologia Generale, Università di Milano

14/04/2008- "Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato"-Massimo MASSAI A, Università di Torino

16/04/2008- " The herpesvirus DNA polymerases: a model for new antiviral drug discovery "- Prof. Giorgio Palù- Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie mediche, Università degli Studi di Padova

17/04/2008- "Epidemiologia dell'infezione da HPV e del cancro della cervice uterina: un modello dinamico" - Dott. Iacopo Bussano

24/04/2008- " Ghrelin e pancreas endocrino "- Prof. Riccarda Granata, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Torino

15/05/2008- " The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions"- Prof. Agata Budkowska, Institut Pasteur, Unité Hépacivirus, Paris

22/05/2008- "HPV e Vaccino"- "Ruolo dei Papillomavirus umani nello sviluppo dei tumori del distretto genitale"- Prof. Santo Landolfo, Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Torino
Dott. Jacopo Bussano
"Dinamica dell'infezione da HPV ed epidemiologia del cancro alla cervice uterina: implicazione per le strategie di vaccinazione" - SCU Epidemiologia dei Tumori, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"

22/05/2008- "La ricerca farmacologica: dal laboratorio alla clinica"- Dot. Domenico Valle, Medical Division Eli Lilly spa, Sesto Fiorentino -FI

23/05/2008- "Sistema degli Endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche"- Prof. Uberto Fagotto, Endocrinologia, Università degli Studi di Bologna

26/05/2008- "Copy number variations: non solo ritardo mentale"- Prof.ssa Orsetta Zuffardi- Facoltà di Medicina e Chirurgia- Università degli Studi di Pavia

5/06/2008- "Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation"- Dr. Piero Carninci, RI KEN, Genome Science Laboratory, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198 Japan

12/06/2008-"Mechanical Ventilation and Multiple Organ Failure"- Dr. Frans B. Plotz, Department Pediatric Intensive Care, Vrije Universiteit, Amsterdam.

CORSO SEGUITO

Corso di statistica medica, Prof. Magnani - Anno 2006
Corso di inglese

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

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

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

-INTERNATIONAL MEETING "STEM CELLS IN TISSUE HOMEOSTASIS, REPAIR AND CELL THERAPY"-

Roma 28-30 Maggio 2008

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 silk-based ligament tissue engineering"

Bosetti M., Boccafoschi F., Calarco A., Leigheb M., Gatti S., Piffanelli V., Peluso G., Cannas M. DiSCAFF, University of Eastern Piedmont "A.Avogadro", Novara, Italy.

J.Biomaterial.Science Plymer Edition, 2008; 19 (9) :1111-23

"GABAA-ergic forebrain pathways following meccano-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. Chiocchetti*, V. Piffanelli^a, P. Car[°], 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. ° Reparto di Neurochirurgia Ospedale Maggiore della Carità, Novara
(in progress)

"Different modalities of apoptosis in periprosthetic membranes"

M. Sabbatini, V. Piffanelli, F. Boccafoschi, S. Gatti, F. Reno', M. Bosetti, Massè A. °, M. Cannas. Human Anatomy Laboratory, Research Center for Biocompatibility, Clinical and Experimental Medicine Department, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy.

°CTO, 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.

Neuroscience 152 (2008) 449-458