

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

**Dottorato di Ricerca in Malattie Osteometaboliche e
Disordini del Metabolismo Idroelettrolitico e Acido-Base**

XXIII Ciclo

**LE RISPOSTE DELLE CELLULE MESENCHIMALI
ESPOSTE ALLA TOPOGRAFIA DI SUPERFICI DI TITANIO:
IL RUOLO DI β -CATENINA**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo Sansoni

Tutore:

Chiar.mo Prof. Guido Macaluso

Dottorando:

Dott.ssa Maria Clotilde Carra

Indice:

ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE	
1.1 Il tessuto osseo	7
1.1.1 Le cellule	
1.1.2 La regolazione molecolare del differenziamento delle cellule ossee	
1.1.3 Il riassorbimento e la deposizione ossea	
1.1.4 Il rimodellamento osseo	
1.2 La via di segnalazione Wnt	17
1.2.1 Il segnale Wnt/ β -catenina regola la massa ossea	
1.3 Lo stress ossidativo: proteine FOXO e β -catenina	22
1.4 Le cellule e il titanio	25
1.4.1 Le interazioni tra cellule e biomateriali	
1.4.2 Il comportamento delle cellule su diverse superfici in titanio	
2. SCOPO DEL LAVORO	30
3. MATERIALI E METODI	31
3.1 Le superfici in titanio	31
3.2 Linee e colture cellulari	31
3.3 MTT test	32

3.4 Vitalità cellulare	33
3.5 Luciferase-reporter assay	34
3.6 Espressione di geni osteogenici	37
3.7 Analisi Statistiche	42
4. RISULTATI	43
4.1 La via di segnalazione Wnt è up-regolata nelle cellule mesenchimali che crescono su superfici ruvide	43
4.2 L'up-regolazione di Wnt determinata dalle superfici ruvide è mediata dai meccanismi di controllo della degradazione della β -catenina	45
4.3 La stimolazione dei geni bersaglio Wnt/ β -catenina è up-regolata nelle cellule su superfici ruvide	46
4.4 La topografia di superficie diminuisce l'espressione di Axin 2, ma non influenza i livelli di mRNA della β -catenina	47
4.5 Le superfici ruvide promuovono l'espressione di osteocalcina, ma l'inibizione della β -catenina/TCF abolisce l'effetto della topografia sulla differenziazione delle cellule	49
4.6 L'aggiunta di H ₂ O ₂ alle superfici in titanio genera una quantità equivalente di specie ROS	50
4.7 Le cellule in crescita su superfici ruvide sono meno sensibili allo stress ossidativo	51
4.8 L'attività trascrizionale di FoxO è maggiore nelle cellule che crescono su superfici ruvide	53

4.9 Le cellule in crescita su superfici ruvide esprimono alti livelli di geni target FoxO	54
4.10 Lo stress ossidativo inibisce la via di segnalazione Wnt	55
5. DISCUSSIONE	56
6. CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA	64

ABSTRACT

La topografia delle superfici in titanio è considerata uno dei fattori più importanti per il successo degli impianti ossei. E' noto, infatti, che il grado di rugosità delle superfici influenza il comportamento dei precursori mesenchimali delle cellule ossee, modulandone la proliferazione, il differenziamento e la commissione verso il fenotipo osteoblastico. Tuttavia i meccanismi molecolari alla base delle risposte cellulari nei confronti della topografia di superficie sono ancora poco chiari.

L'obiettivo del lavoro è stato quello di studiare il comportamento delle cellule mesenchimali murine cresciute a contatto con differenti superfici in titanio. Si è inoltre analizzato l'effetto di tali superfici sulla crescita cellulare in presenza di stress ossidativo. A tale scopo, cellule C2C12 sono state transfettate con il plasmide per il Wnt3a o per la β -catenina e con un costrutto reporter per TCF basato sull'attività dell'enzima Luciferasi.

La stimolazione della via di segnalazione di Wnt, analizzata mediante lettura al luminometro, risulta aumentata in cellule cresciute su superfici rugose (SLA) rispetto a quelle lisce (polished). Inoltre quando le cellule vengono trasfettate con la forma costitutivamente attiva di β -catenina (SS33Y), le differenze tra le due superfici non sono più apprezzabili. Si è poi proceduto ad analizzare mediante RealTime-PCR i livelli di espressione di geni target della via di segnalazione del Wnt in cellule transfettate con Wnt3a. Cellule a contatto con titanio SLA, in seguito a stimolazione con Wnt3a, mostrano livelli di mRNA dei geni ALP, OPG e Wisp-2 significativamente più elevati rispetto alle cellule cresciute su titanio liscio, mentre i livelli dei geni CX43 e COX-2 sono più elevati su superfici rugose già allo stato basale. Inoltre l'espressione del gene Axin-2, coinvolto nel processo di degradazione di β -catenina, appare ridotta sulle superfici rugose. Allo scopo di analizzare l'influenza della rugosità di superficie sul comportamento cellulare in presenza di uno stato di stress ossidativo, le cellule sono state transfettate con un costrutto reporter per il fattore FoxO. La via

molecolare dipendente dall'attivazione del complesso di trascrizione FoxO/ β -catenina risulta significativamente piú attiva in C2C12 cresciute su superfici SLA sia in assenza di stress ossidativo che dopo stimolazione con 0.1 mM di H₂O₂, e l'espressione dei geni target di FoxO, quali Catalasi e Superossido Dismutasi, enzimi con funzione di difesa nei confronti dell'azione lesiva delle specie reattive all'ossigeno, risulta aumentata sulle superfici rugose. Questi risultati sono coerenti con l'osservazione che il danno da stress ossidativo è minore in cellule cresciute su titanio SLA rispetto a quelle cresciute sul titanio polished.

In conclusione, si può affermare che la topografia delle superfici in titanio influenza in maniera importante il comportamento e la sopravvivenza delle cellule, controllando il bilancio tra i meccanismi molecolari che regolano da un lato la crescita e dall'altro le difese cellulari nei confronti dei radicali liberi dell'ossigeno. Questi risultati mostrano inoltre come la rugosità di superficie influenzi sia il pathway di Wnt sia la via di segnalazione di FoxO attraverso il controllo della degradazione di β -catenina, fornendo così la spiegazione per il comportamento delle cellule cresciute a contatto con superfici ruvide.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il tessuto osseo

Il tessuto osseo è una forma specializzata di tessuto connettivo costituito da diversi tipi di cellule e da una matrice extracellulare che dopo deposizione di idrossiapatite diventa mineralizzata dando così rigidità e resistenza dell'osso. L'osso sostiene e protegge il corpo fornendo i siti di attacco ai tendini e ai muscoli, essenziali per la locomozione. Inoltre, il tessuto osseo costituisce la principale riserva di calcio e fosfati così come molti altri ioni quali magnesio e potassio.

Il tessuto osseo deriva come gli altri tessuti connettivi dal mesoderma embrionale. L'osso è costituito da cellule specializzate inserite in una matrice extracellulare che è a sua volta formata da una fase organica e una fase minerale. Si distinguono quattro differenti tipi di cellule: gli osteoblasti, le lining cells, gli osteoclasti e gli osteociti.

La fase inorganica dell'osso è costituita dal fosfato di calcio $[Ca_3 (PO_4)_2]$ che si combina con idrossido di calcio $[Ca (OH)_2]$ formando idrossiapatite, il principale minerale che forma i cristalli delle ossa.

La componente organica è in gran parte composta da fibre di collagene di tipo I. Il collagene di tipo I è la più abbondante proteina strutturale dell'osso, formando il 90% della matrice ossea. Sono anche presenti piccole quantità di proteine non-collageniche (osteonectina, osteocalcina, fibronectine e osteopontine) così come fattori di crescita.

L'osso maturo è composto da due diversi tipi di tessuti: l'osso esterno, chiamato anche osso corticale ed una rete trabecolare (spongiosa) che rappresenta la parte interna delle ossa.

L'osso corticale è formato da elementi cilindrici chiamati osteoni (sistemi di Havers), composti a loro volta da lamelle concentriche costituite da un canale centrale (canale di Havers) circondato da lamelle di matrice ossea. All'interno delle lamelle si trovano gli osteociti incorporati in piccoli spazi

detti lacune ossee. Il canale di Havers comprende vasi sanguigni e cellule nervose e comunica con gli osteociti attraverso canalicoli. Inoltre, la corticale è ricoperta da una membrana esterna, il periostio, costituito da uno strato esterno fibroso e uno interno che ha un potenziale osteogenico e permette all'osso di ingrandirsi.

L'interno dell'osso è costituito da una rete trabecolare (spongiosa) e dal midollo osseo o tessuto connettivo embrionale. La rete trabecolare assicura elasticità e stabilità allo scheletro. Le diverse strutture, corticale e trabecolare hanno diverse proprietà meccaniche.

1.1.1 Le cellule

Il tessuto osseo è costituito da popolazioni cellulari specifiche e fenotipicamente differenti: cellule osteoprogenitrici, osteoblasti, osteociti e osteoclasti.

Le cellule osteoprogenitrici derivano da cellule mesenchimali presenti all'interno del midollo osseo (Owen M., 1985). Queste cellule hanno la capacità di differenziarsi in diverse linee cellulari, come cellule dell'osso, della cartilagine, del tessuto adiposo, dei tendini, dei muscoli e dello stroma del midollo, modificando le loro caratteristiche morfologiche e fisiologiche in risposta a stimoli specifici (Pittenger MF, et al., 1999). Le cellule osteoprogenitrici sono responsabili della sintesi della matrice ossea, della deposizione e della mineralizzazione e sono impegnate nella rigenerazione ossea (Aubin & Triffit, 2000). Queste cellule mostrano una forma allungata e appiattita, hanno un basso contenuto di citoplasma e un nucleo eterocromatico. Le cellule osteoprogenitrici residenti sulle superfici ossee libere e all'interno del midollo osseo rappresentano un grande riserva di cellule capaci di osteogenesi. Il loro processo di differenziamento verso gli osteoblasti maturi è guidato da numerosi stimoli meccanici e metabolici come l'ormone paratiroideo (PTH), l'ormone della crescita (GH) e il fattore di crescita trasformante-beta (TGF- β).

Gli osteoblasti hanno un ruolo molto importante nel creare e mantenere l'architettura dello scheletro; sono responsabili della deposizione della matrice ossea e della regolazione degli osteoclasti. Sono cellule mononucleate e non totalmente differenziate. Sono cellule specializzate con abbondante citoplasma e quando sono attivate si può notare un grande apparato del Golgi ed un abbondante reticolo endoplasmatico rugoso (Rodan & Rodan, 1984). Inoltre, gli osteoblasti formano giunzioni strette con gli osteoblasti adiacenti e hanno delle regioni della membrana plasmatica specializzate al traffico vescicolare e alla secrezione. Il collagene di tipo I e la fosfatasi alcalina sono markers molecolari per la fase iniziale della differenziazione osteoblastica (Robling B. et al, 2006). L'osteocalcina (OCN), espressa esclusivamente nell'osso e la mineralizzazione della matrice extracellulare sono markers per la fase avanzata di differenziazione osteoblastica. Altri marker importanti sono l'osteonectina, l'osteopontina e la bone-sialoproteina (Nakashima & de Crombrughe, 20.003).

Gli osteoblasti hanno la funzione di sintetizzare la maggior parte delle proteine della matrice extracellulare dell'osso, esprimere i geni necessari per la calcificazione e regolare lo sviluppo e le funzioni degli osteoclasti.

Lo sviluppo degli osteoblasti ha inizio da cellule mesenchimali, i preosteoblasti, i quali matureranno fino a diventare osteoblasti funzionali in grado di sintetizzare matrice ossea.

Dopo che ha avuto luogo la formazione del tessuto osseo, alcuni osteoblasti diventano quiescenti e assumono una forma appiattita. In questa forma quiescente gli osteoblasti sono chiamati anche cellule di rivestimento dell'osso (bone lining cells). Queste cellule di rivestimento dell'osso hanno una forma appiattita e contengono pochi organelli cellulari. Nonostante si sappia poco sulla fisiologia di queste cellule il loro ruolo principale consiste nel regolare la mineralizzazione ossea e l'omeostasi del fosfato e del calcio.

Alcuni osteoblasti rimangono intrappolati nella loro stessa matrice ossea dando luogo a osteociti che gradualmente smettono di sintetizzare matrice osteoide.

Gli osteociti sono considerati la fase terminale del differenziamento degli osteoblasti (Nakamura, 2007). Sono le cellule più abbondanti dell'osso maturo e sono responsabili del suo mantenimento. Gli osteociti maturi sono cellule a forma di stella che risiedono in lacune all'interno dell'osso mineralizzato e presentano numerose estensioni attraverso piccoli canali (canalicoli) che collegano gli osteociti stessi con le cellule sulla superficie endostale. Questi canalicoli servono come via per portare sostanze nutritive e ossigeno dal sangue presente nei capillari agli osteociti.

Anche se gli osteociti hanno un'attività di sintesi ridotta e non sono in grado di divisione mitotica, essi sono coinvolti nel ricambio fisiologico delle ossa: infatti, sembra che gli osteociti agiscano come meccanoceettori ricevendo e trasducendo stimoli meccanici e istruendo gli osteoclasti e gli osteoblasti al processo di rimodellamento.

Infine, ci sono gli osteoclasti che sono cellule giganti multinucleate responsabili del processo di riassorbimento osseo. Gli osteoclasti derivano da precursori emopoietici della linea monocitica e macrofagica (Nobuyuki U. et al 1990; Ross, 2006).

La citochina RANKL (receptor activator of nuclear factor κ B ligand) e il fattore di crescita chiamato fattore stimolante le colonie-1 (CSF-1) sono necessari per indurre l'espressione dei geni che caratterizzano la linea cellulare degli osteoclasti, compresi quelli di codifica della fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), della catepsina K (CATK), del recettore della calcitonina e della β 3-integrina, portando allo sviluppo degli osteoclasti maturi (Boyle et al, 2003). Gli osteoclasti sono costituiti da tre domini di membrana specializzati: un bordo increspato (ruffled border), un dominio funzionale di secrezione e una membrana baso-laterale. Gli osteoclasti sono cellule in grado di sciogliere minerale osseo e degradare la matrice organica in quanto contengono una grande varietà di strutture cellulari specifiche che facilitano questi processi (Aubin & Triffit, 2002).

1.1.2 La regolazione molecolare del differenziamento delle cellule ossee

La formazione e la rigenerazione del tessuto osseo è associata ad una cascata di segnali che portano all'attivazione sequenziale di diversi geni che in risposta a fattori di crescita, influenzano il destino delle cellule progenitrici, la loro differenziazione e la formazione di tessuti appropriati. Questi fattori comprendono proteine che controllano la proliferazione e la differenziazione cellulare, come il fibroblast growth factor (FGF), il transforming growth factor beta (TGF- β), l'insuline-like growth factor (IGF) e le bone morphogenetic protein (BMP).

Sono stati identificati due segnali fondamentali che regolano il processo di osteoclastogenesi: il runt-related transcription factor-2 (RUNX2), necessario per la formazione dell'osso embrionale e la via di segnalazione Wnt, coinvolta nello sviluppo della struttura dello scheletro (Fig.1).

L'espressione di RUNX2 (Komori et al., 1997) in associazione con la distal-less homeobox-5 (Dlx5) e con msh homeobox homologue-2 (MSX2) (Robledo et al, 2002), è necessaria per stimolare la trasformazione delle cellule precursori locali che risiedono nel midollo e nel periostio verso la linea degli osteoblasti. I preosteoblasti dell'osso esprimono la proteina collagene di tipo I e sialoproteina ossea (BSP). Un'ulteriore differenziazione del preosteoblasti verso un fenotipo di osteoblasti maturi che formano l'osso richiede l'espressione di RUNX2 (Ducy et al. 1997), Osterix (OSX) e diversi componenti della via di segnalazione Wnt (Hu & Hilton, 2005).

E' stato dimostrato che RUNX2 è un regolatore positivo dell'espressione genica i cui prodotti sono proteine della matrice extracellulare, come il collagene di tipo I, l'osteopontina, la bone sialoprotein e osteocalcina (Komori et al, 2006).

RUNX2 appartiene alla famiglia di Runt ed è considerato il principale regolatore per la differenziazione degli osteoblasti e per la formazione ossea. RUNX2 è un fattore di trascrizione che interagisce con i promotori dei geni target attraverso il dominio Runt. Le regioni riconosciute da RUNX2 mostrano una consensus sequence specifica degli osteoblasti (OSE2).

Osterix (SP7, OSX) è un altro regolatore trascrizionale essenziale per il differenziamento delle

cellule progenitrici in osteoblasti e quindi per la formazione dell'osso. La trascrizione di Osterix è regolata positivamente da RUNX2 e la delezione di RUNX2 inibisce l'espressione di Osterix in vitro (Nakashima e Zhou, 2002).

La proteina OSX appartiene alla famiglia dei fattori trascrizionali delle Sp/XKLF. E' composta da 428 aminoacidi e contiene un dominio zinc finger che si trova nella parte C terminale. Si tratta di un regolatore specifico degli osteoblasti. Per esempio l'attivazione dei geni dell'osteocalcina è correlata alla presenza di questo regolatore: sembra che Osterix sia un fattore di promozione per la differenziazione dei preosteoblasti in osteoblasti maturi (Baek & Lee 2009).

Gli osteoblasti maturi esprimono la proteina collagene di tipo I (ColI), l'osteocalcina (OC) e un enzima chiave nel processo di mineralizzazione, la fosfatasi alcalina. Come un grande numero di osteoblasti attivi secerne matrice non mineralizzata (osteoidi) e si sposta lontano dalla superficie ossea anticipi di distanza dalla superficie dell'osso, un piccolo numero di queste cellule resta indietro e viene incorporato nella matrice, cominciando a generare lunghe estroflessioni citoplasmatiche per rimanere in comunicazione con le cellule circostanti e up-regolare l'espressione di E11, un marcatore precoce di osteociti (Watterwald A. et al., 1996). A questo punto le cellule sono considerate osteociti immaturi. Quando la matrice è matura e mineralizza, gli osteociti vengono intrappolati in essa e iniziano a maturare e ad esprimere un nuovo set di geni, tra cui la dentin matrix protein-1 (DMP-1), la matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) e SOST.

Lo sviluppo degli osteoclasti segue un corso diverso, cominciando quando una cellula staminale emopoietica viene stimolata a produrre cellule mononucleate che poi diventano preosteoclasti ed entrano nel flusso sanguigno. Questo passaggio richiede l'espressione del fattore stimolante le colonie di macrofagi (M-CSF). I precursori circolanti di solito escono dalla circolazione periferica nei pressi di un sito destinato ad essere riassorbito e si fondono tra loro per formare osteoclasti immaturi multinucleati. La fusione delle cellule mononucleate in un polykaryon (osteoclasta

immaturi) richiede la presenza di M-CSF e RANKL, una proteina transmembrana membro della superfamiglia dei tumor necrosis factor (TNF) (Franzoso G, et al. 1997).

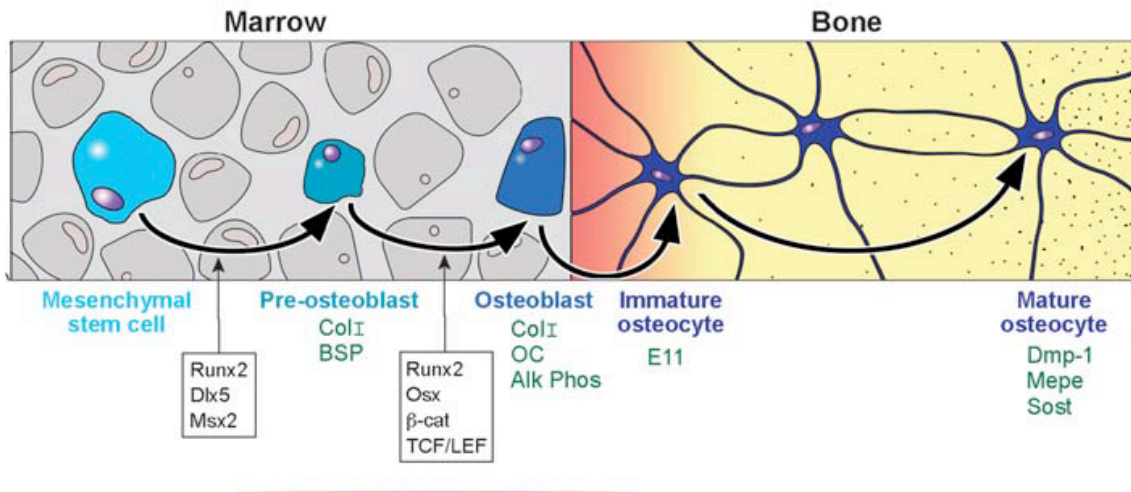


Figura 1. Linea cellulare osteoblastica. Gli osteoblasti derivano da cellule mesenchimali. Le cellule precursori si differenziano in preosteoblasti esprimendo Runx2, Dlx5, e Msx2. I preosteoblasti esprimono il collagene di tipo I e la sialoproteina ossea. Per il raggiungimento del fenotipo cellulare dell'osteoblasta maturo sono necessari l'espressione di Runx2, di osterix, e di membri della cascata Wnt (β -catenin, TCF/LEF1). Gli osteoblasti intrappolati nella matrice calcificata esprimono invece E11, un marker degli osteociti, e DMP-1, Mepe, e Sost, quando la cellula raggiunge il fenotipo di osteocita maturo.

La creazione degli osteoclasti immaturi è associata con l'attivazione della fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), un enzima utilizzato anche in cellule più mature per assistere al riassorbimento osseo. Un'ulteriore differenziazione degli osteoclasti immaturi si verifica solo con la presenza di RANKL. Una volta che gli osteoclasti diventano maturi, l'attività di riassorbimento osseo e la loro sopravvivenza sono regolate da RANKL.

1.1.3 Il riassorbimento e la deposizione ossea

La sequenza degli eventi cellulari necessari al riassorbimento osseo è chiamata ciclo di riassorbimento (Vaananen et al, 2000). Il riassorbimento esige un ritmo sequenziale cellulare: la migrazione degli osteoclasti al sito di riassorbimento, il loro attaccamento alle ossa, la polarizzazione, la formazione di nuovi domini di membrana, la dissoluzione di idrossiapatite, il degrado della matrice organica, la rimozione dei prodotti di degradazione dalla lacuna di riassorbimento e infine l'apoptosi degli osteoclasti o il loro ritorno allo stadio di non-riassorbimento.

Dopo la migrazione degli osteoclasti al sito di riassorbimento, un dominio specifico di membrana, la sealing zone, si forma sugli osteoclasti. La membrana plasmatica si attacca saldamente alla matrice ossea e sigilla il sito di riassorbimento dai territori circostanti. Quando gli osteoclasti si preparano a riassorbire l'osso, si forma un altro dominio specifico della membrana, il ruffled border. Il ruffled border è un organello di riassorbimento ed è formato dalla fusione di vescicole acide intracellulari con la regione di membrana plasmatica adiacente alla superficie dell'osso (Blair et al, 1989; Väänänen et al, 1990). Lo scioglimento del minerale avviene attraverso la secrezione di HCl attraverso il ruffled border alla lacuna di riassorbimento.

Dopo la fase di solubilizzazione dei minerali, diversi enzimi proteolitici lisosomiali proteinasici come la cisteina e la metalloproteinasi della matrice (MMP) degradano la matrice organica.

I prodotti di degradazione vengono rimossi dalla lacuna attraverso un percorso transcitotico e sono liberati nello spazio extracellulare (Nesbitt e Horton, 1997; Salo et al, 1997). Risultati recenti hanno suggerito che la fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAP), un marker di osteoclasti ampiamente utilizzato, sia localizzata nelle vescicole transcitotiche di riassorbimento degli osteoclasti, e si ipotizza che possa generare specie reattive all'ossigeno in grado di distruggere il collagene (Halleen et al. 199; Manolagas SC et al, 1993). Quest'attività, insieme alla co-localizzazione di TRAP e di frammenti di collagene in vescicole transcitotiche, suggerisce che TRAP distrugga i prodotti di

degradazione della matrice nelle vescicole transcitotiche.

Una volta che gli osteoclasti hanno generato una lacuna di riassorbimento, le cellule ossee aderiscono alla reverse zone e depositano strati di osteoide (matrice ossea non mineralizzata) in modo centripeto e depositano cristalli di fosfato di calcio al suo interno, sotto forma di idrossiapatite.

Ad un determinato punto, la deposizione cessa lasciando un canale di Havers nel centro dell'osteone appena formato. L'osteide contiene soprattutto le fibre di collagene di tipo I e una piccola quantità di differenti tipi di proteine chiamate proteine di non-collagene. Queste proteine interagiscono tra loro e possono legarsi a recettori specializzati sulla superficie delle cellule ossee. Questa associazione è importante per l'adesione delle cellule alla matrice ossea e fornisce anche i segnali comportamentali per le cellule.

I diversi tipi di cellule (osteoblasti e osteociti) si occupano quindi della formazione e del mantenimento del tessuto osseo. Gli osteociti sono in grado di percepire le sollecitazioni e sopportare carichi posti sulle ossa e di trasmettere queste informazioni agli osteoblasti presenti superficie ossea, permettendo così all'osso di adattarsi ad alterazioni meccaniche attraverso la formazione di nuovo osso. E' stato identificato un gran numero di molecole che regolano la formazione e la funzione delle cellule osteoblastiche. Gli ormoni circolanti, come l'insulina, l'ormone della crescita, il PTH e i fattori di crescita insulin-like, si combinano con fattori di crescita all'interno dell'osso stesso, come ad esempio il TGF β e le BMPs, per influenzare il differenziamento degli osteoblasti.

1.1.4 Il rimodellamento osseo

La struttura delle ossa, le sue funzioni e il metabolismo sono il risultato di un processo di riassorbimento, omeostasi minerale e rigenerazione ossea. La formazione delle ossa e il processo di

rimodellamento lavorano insieme nel processo di crescita dello scheletro per definire la forma appropriata dello scheletro, mantenere i livelli sierici corretti degli ioni minerali e la riparazione delle regioni strutturalmente compromesse del tessuto osseo. L'osso è costantemente sottoposto a rimodellamento, un processo caratterizzato dalla rimozione localizzata di osso vecchio (riassorbimento), seguito da sostituzione con osso neoformato. Per mantenere l'integrità scheletrica e prevenire le fratture, il degrado e la ricostruzione delle ossa devono avvenire in perfetta sincronia. Se questi processi non sono accoppiati, possono sorgere malattie scheletriche (Baron et al, 2007). Questi processi sono strettamente controllati dal $TGF\beta$, rilasciato durante la degradazione delle ossa (Jameel & Zaidi 2009).

L'osso è rimodellato da gruppi di cellule derivate da fonti diverse, che sono chiamate unità di base multicellulare (BMU): gli osteoclasti e gli osteoblasti, che sono i principali effettori del turnover della matrice ossea (Martínez-Reina & García-Aznarblaré 2009). Esiste un equilibrio tra la quantità di osso riassorbito dagli osteoclasti e la quantità di tessuto osseo formatosi dagli osteoblasti (Frost et al, 1964).

Il concetto di rimodellamento osseo si basa sull' ipotesi che i precursori degli osteoclasti si attivino e si differenzino in osteoclasti dando inizio al processo di riassorbimento osseo. Questa fase è seguita da fasi di formazione dell'osso, quali il reclutamento di osteoblasti e la formazione e mineralizzazione dell'osteoido.

Come scritto sopra, l'osteoclastogenesi è regolata da una rete molecolare che coinvolge RANKL/RANK/OPG. RANKL è prodotto da una varietà di cellule, comprese le cellule stromali di supporto, linfociti B, cellule dendritiche e osteoblasti. RANKL può legarsi a recettori situati sulla superficie dei precursori degli osteoclasti, e la loro espressione è stimolata dal legame di M-CSF sul suo recettore c-FMS.

E' stato identificato un fattore solubile che inibisce l'attività del RANKL, l'osteoprotegerina (OPG). OPG è un potente inibitore della formazione di osteoclasti che agisce come recettore solubile per

RANKL e riduce l'osteoclastogenesi occupando i siti di legame di RANKL nei recettori RANK sugli osteoclasti (Lorenzo et al, 2008). Di conseguenza, l'osteoclastogenesi è regolata positivamente aumentando l'espressione di RANKL e diminuendo l'espressione di OPG, o viceversa le proporzioni possono essere invertite per diminuire l'attività di riassorbimento. In questo modo il segnale OPG / RANKL funziona come un reostato molecolare per il riassorbimento osseo e svolge un ruolo fondamentale nel rimodellamento osseo.

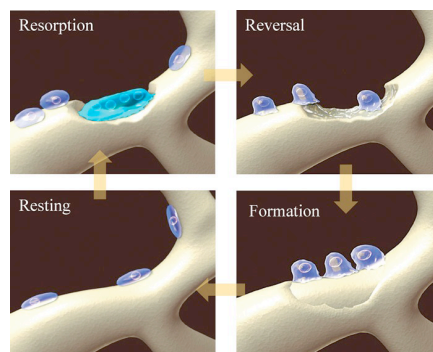


Figura 2. Il rimodellamento osseo. Questo processo richiede l'equilibrio tra la deposizione di osso da parte degli osteoblasti e il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti.

1.2 La via di segnalazione Wnt

La via di segnalazione Wnt è uno dei meccanismi fondamentali che dirige la proliferazione cellulare, la polarità delle cellule e determina il destino cellulare durante lo sviluppo embrionale e l'omeostasi dei tessuti (Nusse R., 2008).

La via di segnalazione Wnt è anche fondamentale nel regolare la crescita delle cellule staminali e la differenziazione delle cellule adulte (Dobel & Patel 2007).

La cascata di segnalazione Wnt è innescata dal legame delle proteine della famiglia Wnt (sono state identificate più di dodici differenti proteine Wnt) a un complesso di corecettori costituito da sette domini transmembrana del recettore frizzled (Fz, un recettore accoppiato ad una G-protein) (Logan

& Nusse, 2004) e le proteine 5 e 6 correlate ai recettori per le lipoproteine a bassa densità (LRP5 o LRP6) (Ha et al., 2004; Tamai et al., 2000; Zeng e Huang 2008). Il segnale viene trasmesso attraverso il reclutamento di proteine con la porzione intracellulare C-terminale del corecettore attivato Fz e LRP5/6.

Da questo punto, disheveled (DVL) viene reclutato e i segnali post-traduzionali sono modificati. L'attivazione del DVL libera la β -catenina, una proteina della famiglia Armadillo che è un costituente fisiologico delle giunzioni intercellulari. La β -catenina contiene un dominio centrale di 12 ripetizioni Armadillo che sono specifici motivi di aminoacidi che mediano le interazioni tra la β -catenina e altre proteine (Xu & Kimelman, 2007). A seconda della natura specifica del Wnt e del Fz che sono complessati con LRP5/6, possono essere attivati tre percorsi indipendenti: la via canonica Wnt o β -catenina dipendente, la via non canonica che comprende i percorsi calcio-dipendenti e del Wnt / cAMP, così come la via mediata dal DSH e da JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) (Fig.3).

Il Wnt/ β -catenina o via canonica è particolarmente importante per la formazione ossea e il rimodellamento (Galli et al., 2010; Bennett 2007). Studi recenti suggeriscono che il percorso canonico Wnt / β catenina sia coinvolto nello sviluppo precoce delle ossa attraverso la promozione della differenziazione delle cellule osteoprogenitrici (Hill 200) e il controllo della differenziazione e del destino degli osteoblasti.

La via canonica di segnalazione Wnt si basa sulla stabilizzazione della β -catenina citosolica. La β -catenina è un componente delle strutture di adesione cellula-cellula (giunzioni aderenti) ed è associata con ad un complesso citoplasmatico contenente la proteina poliposi adenomatosa coli (APC), la glicogeno sintasi chinasi-3b (GSK-3b), e l'Axin (Lee e Salica 2003). L'assenza di Wnt o l'inibizione del suo legame con il recettore di membrana portano alla degradazione di β -catenina e all'inattivazione della cascata di segnalazione: in questo caso, la β -catenina viene fosforilata dalle chinasi, principalmente la GSK-3 β e la caseina chinasi 1 (Aberle 1997; Kimelman e Xu 2006).

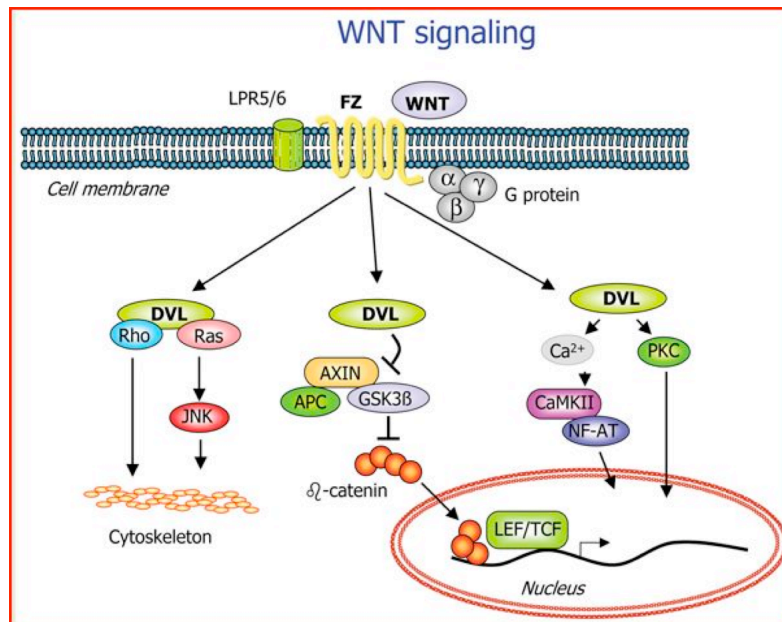


Figura 3. Rappresentazione schematica della via di segnalazione Wnt.

Il legame di Wnt al suo recettore comporta l'inibizione dell'attività di GSK-3β. Questa inibizione media la prevenzione della degradazione della β-catenina, portando a un accumulo di β-catenina nel citoplasma.

Dopo aver raggiunto un certo livello di concentrazione, la β-catenina migra nel nucleo e si lega al fattore proteico TCF / LEF (T cell factor/lymphoid- enhancer factor protein)(Beherens 1996), spiazzando il corepressore trascrizionale “Groucho”, il quale promuove la deacetilazione degli istoni e la compattazione della cromatina (Daniels e Weis, 2005). “Groucho” inoltre è responsabile del reclutamento di altri coattivatori trascrizionali, ad esempio la proteina p300 e la proteina p300/CBP (cAMP response element-binding protein) per regolare l'espressione dei geni della via canonica Wnt, come la fosfatasi alcalina (Mosimann e Hausmann 2009) (fig.4).

Le proteine TCF sono un gruppo fattori leganti il DNA ad alta mobilità (HMG) che una volta legati alle sequenze consenso del DNA, CCTTTGWW sensibile alla Wnt (WRE, Wnt responsive element), causano al DNA una significativa flessione che può alterare la struttura locale della

cromatina (MacDonald e Tamai 2009).

La via di segnalazione Wnt è strettamente regolata da numerosi fattori appartenenti a diverse famiglie con funzione antagonista (Moon & Brown 2002). Regolatori extracellulari della via di segnalazione Wnt includono due principali tipi di inibitori. Nel primo gruppo ci sono proteine che legano e neutralizzano Wnt, agendo come decoy receptors solubili Fz e impedendo il legame di Wnt al recettore Fz. Il secondo gruppo comprende le proteine dickkopf (DKK) e sclerostina (prodotto del gene SOST) che si legano e inattivano la via di segnalazione dai recetto LRP5/6.

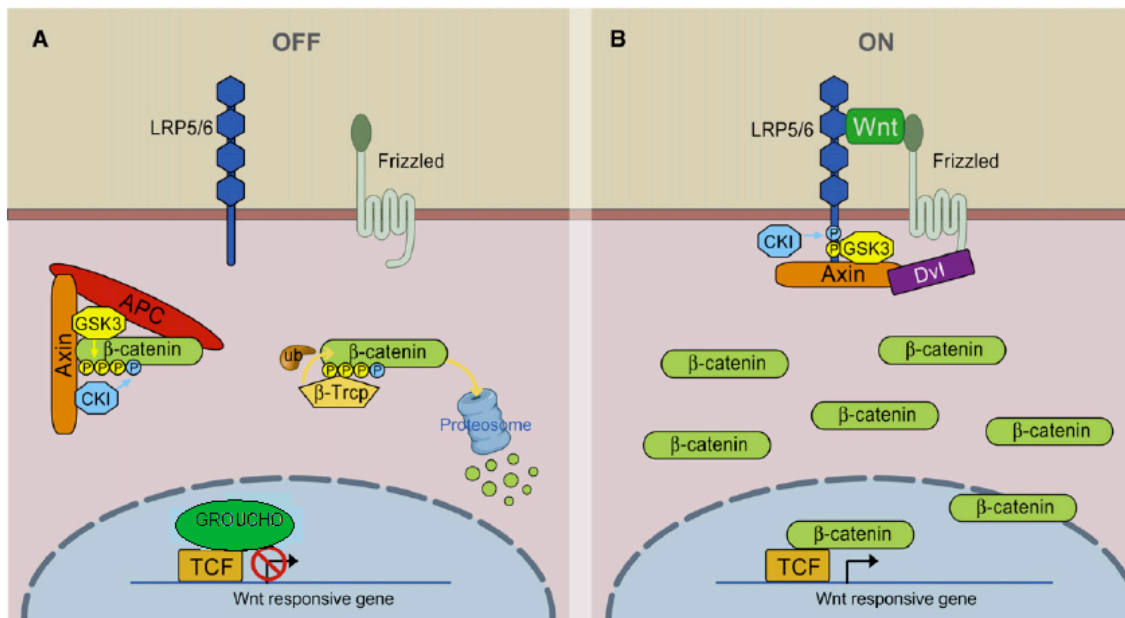


Figura 4. La via canonica di segnalazione Wnt. *A)* Nelle cellule non esposte al Wnt, β-catenina si associa con ed è fosforilata dalla distruzione del complesso composto da Axin, APC, and GSK-3. La β-catenina fosforilata è poi degradata. Nello stesso tempo, i geni target del Wnt sono soppressi dall'associazione di TCF con Groucho. *B)* Il legame di Wnt con il recettore Frizzled e LRP induce la fosforilazione di LRP e il reclutamento di Axin. Anche Dsh è fosforilata, e il complesso Axin/APC/GSK-3 è inibito, portando all'accumulazione di β-catenina citosolica che poi transloca nel nucleo, rimpiazza Groucho, e attiva i geni target.

DKK1 inibisce la segnalazione Wnt inducendo l'internalizzazione e la degradazione di LRP6 attraverso le proteine transmembrana Kremen (KRM) (Mao et al., 2002) e diminuendo così il numero di corecettori Wnt disponibili per la segnalazione.

Gli inibitori citosolici della via di segnalazione Wnt si trovano anche all'interno delle cellule. I più abbondanti sono GSK-3 β , la proteina Axin e il tumor suppressor adenomatous polyposis coli. Tutte queste proteine sono inserite nel complesso di fosforilazione della β -catenina che porta alla degradazione della β -catenina.

Infine, nel nucleo l'attività trascrizionale o la localizzazione nucleare del complesso β -catenin/Tcf è soggetto ad uno stretto controllo e regolazione.

1.2.1 Il segnale Wnt/ β -catenina regola la massa ossea

Il ruolo della via segnalazione Wnt nel regolare la formazione ossea trabecolare e la massa ossea è stato confermato da numerosi studi effettuati sull'uomo e in diversi modelli animali. Infatti, le mutazioni genetiche che comportano una perdita o un guadagno nella funzione di LRP5 conduce rispettivamente alla sindrome di osteoporosi-pseudoglioma (Gong et al, 2001) o al carattere ereditario di alta massa ossea nell'uomo (LM Boyden. et al, 2002). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati in topi con deficit di LRP5 che mostrano una formazione ossea e una proliferazione degli osteoblasti diminuite (Kato et al, 2002), mentre i topi transgenici che esprimono negli osteoblasti una mutazione che attiva la LRP5 presentano un aumento della formazione ossea e un'elevata massa ossea (Babij 2003). Molti altri studi condotti su modelli di topi transgenici hanno dimostrato che una upregulation della via Wnt porta ad un aumento della massa ossea (Bennett et al, 2007). Allo stesso modo, la deplezione degli antagonisti del segnale Wnt come SFRP-1, Dkk1, o dell'adenomatosis polyposi coli, porta a un accumulo dell'osso trabecolare in topi adulti (Manolagas, Almeida et al 2007; Morvan F. et al 2006). Tutti questi risultati nel loro insieme,

dimostrano che la via di segnalazione Wnt agisce come regolatore centrale della massa ossea.

L'importanza della via di segnalazione Wnt per la regolazione della massa ossea si spiega con il ruolo centrale della β -catenina nel determinare la differenziazione di cellule progenitrici multipotenti di origine mesenchimale verso la linea cellulare degli osteoblasti (Ling, Nurcombe & Cool 2009). Oltre a promuovere l'osteoblastogenesi, il segnale Wnt/ β -catenina blocca l'adipogenesi, un altro potenziale destino delle cellule mesenchimali multipotenti (Kang & Bennett 2007).

Inoltre, la β catenina regola il rimodellamento osseo aumentando l'espressione di osteoprotegerina (OPG) (Glass et al. 2005) un gene target del complesso β -catenina/TCF, e del recettore decoy di RANKL, portando quindi all'osteoclastogenesi e al riassorbimento osseo. La deplezione di β -catenina è associata a un aumento dell'osteoclastogenesi, del riassorbimento osseo e a una ridotta espressione di osteoprotegerina. La via di segnalazione Wnt/ β -catenina aumenta la massa ossea attraverso la stimolazione dell'osteoblastogenesi e la soppressione dell'apoptosi degli osteoblasti, dell'adipogenesi, e dell'osteoclastogenesi.

1.3 Lo stress ossidativo: proteine FOXO e β -catenina

I radicali liberi dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), come gli anioni superossido (O_2^-), i radicali ossidrilici (OH) e il perossido d'idrogeno (H_2O_2), sono continuamente prodotti dal metabolismo aerobico e possono causare perossidazione lipidica, danni alle proteine e lesioni al DNA che portano alla morte cellulare. Allo stesso tempo però, a concentrazioni inferiori essi servono da molecole di segnalazione per il controllo della proliferazione e della differenziazione cellulare. Alti livelli di ossidanti prodotti durante il normale metabolismo cellulare (trasporto mitocondriale degli elettroni) o da stimoli ambientali (citochine, radiazioni UV), possono perturbare il normale equilibrio redox (ossido-riduttivo) della cellula e portare la cellula ad uno stato di stress ossidativo (Holbrook et al, 2000). A livello cellulare, un danno ossidativo suscita un ampio spettro

di risposte che vanno dalla proliferazione all'arresto della crescita o della differenziazione, alla senescenza e alla morte cellulare.

Numerosi studi hanno dimostrato un collegamento tra l'invecchiamento e lo sviluppo di malattie e l'aumento dei livelli di stress ossidativo. Inoltre l'aumento dello stress ossidativo è un fenomeno tipico durante l'infiammazione. I ROS si accumulano nell'osso e possono così influenzare i processi biologici che avvengono all'interno del tessuto, compreso per esempio il processo di osteointegrazione, cioè la formazione di osso in intimo contatto con le superfici di un impianto endosseo.

Per contrastare l'effetto negativo dello stress ossidativo, le cellule possiedono un complesso meccanismo di antiossidanti come il glutatione e il Gadd45, atti riparare i danni al DNA (Tran e Brunet 2002), e il complesso programma trascrizionale di FOXO (Korswagen 2006). Quest'ultima risposta richiede l'attivazione della famiglia di FoxO, composta da quattro membri: FoxO1 (o FKHR), FoxO3a (o Fkhr11), FoxO4 (o Afx), e FoxO6 (Almeida, 2007). Le FoxOs sono membri della classe O ("other") della superfamiglia Forkhead e sono tutti caratterizzati da un dominio di 100 aminoacidi atto a legare il DNA. In assenza di fattori di crescita, dell'insulina o dello stress ossidativo, le FoxOs che risiedono nel nucleo possono regolare il destino della cellula attraverso la trascrizione di geni bersaglio coinvolti nell'apoptosi cellulare, come TRAIL, FasL e Bim, oltre a controllare il ciclo cellulare, la riparazione del DNA e la longevità cellulare (Accili e Arden, 2004). FoxO agisce come un potente attivatore trascrizionale che si lega al core della sequenza consenso di riconoscimento TTGTTTAC (Xuan Zang e 2005) e protegge le cellule quiescenti dallo stress ossidativo aumentando la quantità di manganese superossido dismutasi (MnSOD)(Geert & Kops , 2002), di superossido dismutasi e di Catalase in grado di neutralizzare ROS.

La resistenza FoxO-mediata allo stress ossidativo è influenzata da molteplici altre vie. La β -catenina, essenziale per l'adesione cellulare poiché forma un legame tra E-caderina e il citoscheletro di actina, può servire anche come co-fattore di trascrizione per attivare molteplici vie di

segnalazione come la via canonica di segnalazione Wnt e la via di segnalazione FoxO (Manolagas SC, Almeida 2007). È interessante notare che la β -catenina è stata recentemente indicata come una molecola chiave nella difesa contro lo stress ossidativo, servendo come cofattore nella trascrizione della FoxO (Essers et al 2005; Hoogeboom et al 2008): in modelli di cellule osteoblastiche, ROS induce l'interazione di FoxOs con β -catenina, deviando il pool di β -catenina lontano da TCF/LEF, e promuovendo la trascrizione FoxO-mediata a spese della trascrizione β -catenin/TCF-mediata e la differenziazione degli osteoblasti, risultando alla fine in una up-regulation dei geni bersaglio di FoxO, mentre i geni bersaglio di Wnt sono inibiti (Almeida et al., 2007, Almeida et al., 2009)(Fig.5).

FoxOs è un regolatore positivo della formazione ossea in quanto favorisce la sintesi proteica e la resistenza degli osteoblasti allo stress ossidativo (Rached & Kode, 2010).

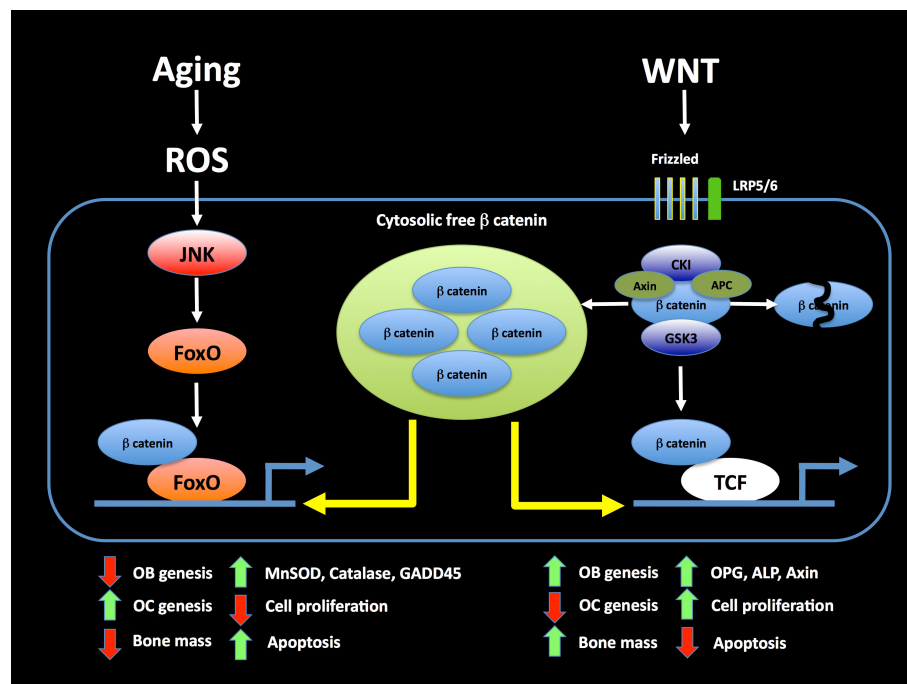


Figura 5. I ROS antagonizzano gli effetti di Wnt/ β -catenina dividendo β -catenina dal TCF.

1.4 Le cellule e il titanio

1.4.1 Interazioni tra cellule e biomateriali

I biomateriali sono utilizzati in sostituzione di strutture perse o per promuovere la formazione di nuovo tessuto (Burg et al., 2000). Le caratteristiche della superficie del substrato su cui crescono le cellule ossee sono estremamente importanti. Il substrato non è una superficie di ancoraggio passiva ma è in grado di stimolare l'adesione e la proliferazione cellulare.

Il titanio e le sue leghe sono considerati materiali biocompatibili. Molte strutture per impianti endo-ossei sono state sviluppate con questi materiali. Infatti, possiedono proprietà meccaniche adatte per applicazioni di chirurgia ortopedica e orale. Il titanio grazie alle sue caratteristiche, quali la resistenza alla corrosione nei fluidi corporei, la natura inerte e la capacità di assorbire facilmente proteine sulla sua superficie, è il materiale più accettato per applicazioni mediche cliniche (Bikromjit et al., 2009).

Il titanio commercialmente puro (CPTI), mostra diversi gradi di purezza (classificati da 1 a 5) a seconda del contenuto di ossigeno, carbonio e ferro (Le Guehenec, 2007). La quantità e la qualità della proliferazione cellulare, il grado di attecchimento, la diffusione e il differenziamento cellulare sulle protesi in titanio dipendono dalle proprietà delle superfici. Topograficamente parlando, ci sono due tipi di superfici: superfici lisce e superfici rugose. Quest'ultime possono essere suddivise in tre livelli: macro, micro e nano. Sono stati messi a punto vari metodi per creare superfici rugose. Questi metodi utilizzano la metodica di titanium plasma-spraying (TPS), sabbiatura con particelle di ceramica, l'anodizzazione in acidi forti.

Il metodo TPS consiste nell'iniettare polveri di titanio nel plasma torch ad alta temperatura; in questo modo le particelle di titanio sono proiettate sulle superfici degli impianti dove si condensano e si fondono formando un film ruvido di rivestimento che aumenta la superficie di contatto dell'impianto. Il secondo metodo consiste nel soffiare (getto d'aria) l'impianto con particelle di

ceramica dura (allumina, ossido di titanio, particelle di fosfato di calcio) che vengono spruzzate attraverso un ugello ad alta velocità. A seconda delle dimensioni delle particelle di ceramica può essere prodotto un diverso grado di rugosità. La corrosione con acidi forti come HCl, H₂SO₄, HNO₃ producono micro pits sulle superfici di titanio con dimensioni che vanno da 0,5 a 2 micron di diametro, producendo una superficie micro-rugosa. Infine, l'anodizzazione del titanio in acidi forti ad alta densità di corrente o potenziale risulta in uno strato di ossido di titanio che crea superfici con micro o nano porosità.

Un altro metodo per ottenere una superficie per impianti endoossei che non solo garantisca l'osteointegrazione ma anche mostri un effetto osteoconduttivo, è il rivestimento della superficie con fosfato di calcio generalmente composto da idrossiapatite. Lo strato di apatite biologica che ricopre l'impianto serve come film osteoconduttivo ricco di proteine che assicura l'attecchimento degli osteoblasti e la loro crescita.

L'interazione tra osteoblasti e il materiale utilizzato è strettamente correlata a diversi parametri come la topografia (micro / nano struttura porosa), la chimica e l'energia superficiale del titanio: le differenti proprietà di superficie possono quindi avere effetti decisivi sul comportamento delle cellule (Boyan & Dean 1996;. Anselme et al,2005), influenzando la risposta cellulare e la produzione di fattori locali. Sono in corso complessi studi di ricerca per comprendere l'interazione degli osteoblasti con i biomateriali in titanio.

L'interazione delle cellule con le superfici su cui crescono è un processo step-by-step che inizia dal primo contatto fino alla migrazione cellulare (Anseleme K. et al., 2000). L'intero processo di interazione tra cellule e superficie può essere suddivisa in diverse fasi: attecchimento, adesione e diffusione. La qualità di queste fasi influenza la capacità delle cellule di proliferare e differenziarsi in contatto con l'impianto. In vivo, l'adsorbimento delle proteine si crede sia il primo evento che si svolge dopo il contatto dei fluidi corporei con il biomateriale e che sia influenzato dalle caratteristiche fisico-chimiche dello stesso. Questa fase è seguita dalla fase di attecchimento che

avviene rapidamente (Boyan et al, 1996;. Meyer et al, 1997). Le cellule interagiscono con i loro substrati artificiali tramite legami focali delle integrine del citoscheletro con le proteine presenti sulla superficie del materiale (Meyer et al., 1997). Le integrine sono una classe di molecole che si estendono attraverso la membrana plasmatica delle cellule, legando gli elementi del citoscheletro a siti di legame delle proteine extracellulari, come la fibronectina e la laminina, assicurando l'adesione cellulare al substrato (Boyan et al., 2001). Le proteine del citoscheletro si presume siano le più importanti strutture intracellulari responsabili dell'adesione cellulare e della trasmissione del segnale. Il numero e la distribuzione di queste adesioni possono portare a cambiamenti nella forma delle cellule (Gronowicz & McCarthy, 1996). Questi cambiamenti di forma sono poi trasdotti dal citoscheletro al nucleo, dove possono portare a un cambiamento dell'espressione genica (Akiyama et al, 1996;. Chicurel et al, 1998). La proliferazione cellulare e la migrazione seguono la fase di attecchimento tra la cellula e la superficie del materiale (Anselme et al., 2000). La formazione di tessuto mineralizzato simile all'osso alla superficie del materiale dovrebbe essere l'ultima fase di della reazione degli osteoblasti (Davies et al, 1990.): l'espressione delle fasi finali del differenziamento osteogenico su superfici di biomateriali implica la produzione di una matrice simile all'osteoidi (Plate et al, 1998;. Wiesmann et al, 2003.) e l'espressione di marcatori di differenziazione degli osteoblasti come gli OCN.

1.4.2 Il comportamento delle cellule sulle diverse superfici in titanio

La superficie dell'impianto è un fattore critico per l'osteointegrazione (Albrektsson & Brånemark 1981; Le Guehenec 2007) e le sue proprietà come la topografia, la composizione chimica, la carica superficiale e la bagnabilità giocano un ruolo centrale nel modulare il comportamento cellulare all'interfaccia osso-impianto, l'adesione cellulare e la differenziazione iniziale (Schwartz & Lohmann, 1999; Schneider & Perinpanayagam, 2003). Uno degli aspetti più interessanti è vedere

come i segnali esterni e la topografia di superficie dell'impianto modulino questi passaggi e le funzioni della cellula.

La rugosità superficiale è una caratteristica topologica che può influenzare il comportamento delle cellule ossee. Molti studi si sono concentrati sulla influenza della rugosità delle superfici in titanio sulla proliferazione e la differenziazione delle cellule ossee mostrando che una maggiore rugosità superficiale favorisce la differenziazione osteoblastica.

La rugosità delle superfici, infatti, ha un ruolo preminente sia per la qualità che per la velocità di osteointegrazione degli impianti in titanio. Impianti ad alta rugosità come TPS o sabbiati-mordenzati (grit-blasted) favoriscono l'ancoraggio meccanico e la fissazione primaria all'osso (Muller & Gross, 2003). Topografie in scala nanometrica sono state utilizzate per promuovere l'adsorbimento delle proteine e l'adesione delle cellule osteoblastiche e favorire il tasso di guarigione del tessuto osseo nella regione peri-implantare (Zhu e Chen, 2004).

Le cellule che crescono su superfici ruvide riorganizzano il loro citoscheletro per adattarsi meglio al substrato circostante (Zinger, Anselme et al, 2004; Luthen, Lange et al, 2005). Le superfici con rugosità elevata generalmente dimostrano di favorire il contatto osso-impianto e quindi l'ancoraggio in modo maggiore rispetto alle superfici lisce (Buser & Schenk 1991). Diversi studi in vitro hanno dimostrato che i livelli di attecchimento sono più alti su una superficie ruvida rispetto a superfici lisce e che la morfologia della cellula è influenzata dalla natura del substrato sottostante (Bowers et al, 1992; Linez-Bataillon P. et al. 2002).

È stato anche osservato che i precursori mesenchimali coltivati su superfici ruvide si differenziano preferenzialmente nella linea cellulare osteoblastica e che le superfici ruvide sono superiori alle superfici lisce nel promuovere il differenziamento osteogenico delle cellule preosteoblastiche, come dimostrato dall'aumentata espressione dei primi marcatori osteogenici come Spp1, RUNX2 e BSP (Wall & Donos, 2009). Inoltre è stato dimostrato che le culture di linee cellulari osteoblastiche esprimono elevati livelli di marcatori del fenotipo osteoblastico quando coltivate su superfici ruvide

(Schwartz & Lohmann, 1999; Keselowsk & Wang, 2007; Zhao & Raines, 2007). La proliferazione e la differenziazione di cellule derivanti dall'osso mandibolare umano sono favorite dalla rugosità delle superfici di un impianto in titanio, come dimostrato da un'augmentata quantità di $[H]^3$ - timidina incorporata e dalla sintesi di osteocalcine (Mustafa & Wennerberg, 2001). Gli stessi fenomeni sono stati osservati in studi in vitro con MC3T3 e cellule coltivate su superfici implantari di titanio con diverse rugosità, come dimostra il fatto che l'augmentata attività della fosfatasi alcalina si correla direttamente al grado di rugosità della superficie (Le Guehenec, 2008).

Un esame al microscopio elettrico a scansione delle cellule ossee su materiali con rugosità superficiale diversa ha dimostrato che la diffusione e la formazione dello strato continuo di cellule è migliore su superfici lisce rispetto a superfici rugose (Anselme K. et al., 2007). Anche se prove importanti, sia in vitro (Linez-Bataillon, Monchau et al, 2002; Lossdorfer, Schwartz et al, 2004) che in vivo (Buser, Broggin, et al, 2004; Germanier, Tosatti et al, 2006) hanno dimostrato che le superfici ruvide offrono migliori condizioni per il successo dell'impianto, devono ancora essere chiariti molti percorsi molecolari attivati dalla topografia di superficie e molti aspetti fondamentali del controllo della risposta molecolare su superfici in titanio. Probabilmente gli effetti della topografia di superficie dell'impianto sono mediati e controllati, almeno in parte, dalla via canonica di Wnt che sembra essere substrato-dipendente e sembra modulare l'espressione di alcuni geni che coprono un ampio ventaglio di attività funzionali delle cellule: segnalazione di trasduzione, trascrizione, regolazione del ciclo cellulare, sviluppo del citoscheletro, attività enzimatica e apoptosi cellulare (Carinci e Pezzetti, 2003).

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro è quello di esaminare la risposta delle cellule mesenchimali in crescita a contatto con dischi di titanio con varie topografie di superficie, tra cui una superficie liscia e una ruvida (SLA).

Il nostro obiettivo è stato quello di stabilire come la topografia superficiale influenza il comportamento delle cellule mesenchimali e il loro differenziamento attraverso la regolazione della via canonica di segnalazione Wnt. Inoltre è stato possibile osservare come la topografia di superficie influenza la risposta allo stress delle cellule mesenchimali in presenza di radicali liberi dell'ossigeno. Nello specifico, si è esaminato se la trascrizione FoxO-mediata viene attivata nelle cellule che crescono su superfici in titanio SLA come conseguenza di ROS.

L'obiettivo è stato quello di capire se ROS provocassero una maggiore espressione dei geni bersaglio di FoxO in cellule che crescono su superfici ruvide piuttosto che su superfici lisce e se questo risultato fosse associato a un aumento delle difese contro lo stress ossidativo.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Le superfici in titanio

I campioni di titanio commercialmente puro, lucido o mordenzato e sabbiato (SLA), utilizzati per gli esperimenti di questo lavoro di tesi, sono stati gentilmente forniti dallo Straumann Institut AG (Basilea, Svizzera). Tutte le superfici sono state preparate come dischetti sterili di 1 mm di spessore e 15 mm di diametro, per adattarsi in un pozzetto di una piastra di coltura da 24 pozzetti (Euroclone, Pero, MI, Italia).

Le superfici lisce hanno un indice di rugosità media (Ra) inferiore a 0,6 micron mentre le superfici SLA hanno una Ra tra i 4 e 5 micron.

3.2 Linee e culture cellulari

Sono stati utilizzati due diversi modelli di colture cellulari per gli studi descritti: la linea cellulare C2C12 e la linea cellulare MC3T3, ottenute rispettivamente dall'European Catalog of Cell Culture (Health Protection Agency Culture Collections, Salisbury, Regno Unito) e dalla American Type Culture Collection (LGC Norme SRL, Sesto S. Giovanni, MI, Italia).

La linea cellulare C2C12 è una linea di cellule mesenchimali murine capaci di differenziarsi sia lungo la linea miocitica sia lungo la linea osteoblastica. Questa linea cellulare C2C12 è comunemente usata per studiare la via di segnalazione Wnt-canonica (Katagiri & Yamaguchi, 1994).

MC3T3 è una linea cellulare osteogenica che presenta caratteristiche tipiche degli osteoblasti maturi. Queste cellule derivano dall'osso primario della calvaria del topo e hanno la capacità in vitro di differenziarsi in osteoblasti e depositare materiale mineralizzato. Per queste ragioni, le cellule MC3T3 sono un modello molto utilizzato per studiare vari aspetti della biologia cellulare

ossea (Sudo & Kodama, 1986).

Le cellule sono state coltivate in medium Dulbecco modificato (Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM, Euroclone), arricchito con 10% di siero bovino fetale (FBS, Euroclone), 1% di penicillina e streptomicina (Penstrep, Euroclone) e 1% di glutamina (Euroclone).

Per eseguire il test per la vitalità e per valutare l'espressione genica, rispettivamente 30.000 o 100.000 cellule C2C12 sono state seminate su dischi in titanio liscio o SLA in 1 ml di terreno completo in piastre a 24 pozzetti (Euroclone), in triplicato, ed analizzati 24 ore dopo la semina. Per i saggi reporter, le cellule C2C12 e MC3T3 sono state seminate su superfici di titanio in 0,5 ml/pozzetto (OptiMEM, Invitrogen, San Giuliano Milanese, MI, Italia), 5% di FBS, 1% Penstrep alla densità di 100.000 o 125.000 cellule / pozzetto e le cellule sono stati analizzate dopo 24 ore.

3.3 MTT test

Per valutare la vitalità cellulare è stato eseguito il test MTT (Roche Applied Science, Penzberg, Germania). Il test MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide) è un saggio di laboratorio colorimetrico per misurare l'attività di enzimi mitocondriali che riducono l'MTT a formazano, facendo virare il composto da un colore giallo ad un colore blu-violetto intenso, processo che si verifica solo nelle cellule metabolicamente attive.

Le cellule C2C12 sono state lavate con PBS in un fiasca da coltura e sono state trattate con 4 ml di tripsin-EDTA (EuroClone) per 4 minuti a 37 ° C in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂.

Le cellule sono state sospese in 6 ml di DMEM contenente 5% di siero fetale bovino e poi centrifugate a 1500 rpm per 6 minuti. Il surnatante è stato scartato e le cellule sono state sospese nuovamente in un terreno completo, contate con la metodica del reticolo della camera di Burker e poi ridisposte su una piastra alla densità di 100.000 cellule C2C12 su dischi lisci o SLA.

Ventiquattro ore dopo l'allestimento delle piastre di coltura, 500 microlitri di medium di coltura

sono stati scartati da ogni pozzetto. A seguire, 50 microlitri di substrato MTT sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata in atmosfera umidificata a 37°C per 4 ore. Dopo il tempo di incubazione, 500 microlitri di soluzione solubilizzata sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati nuovamente per tutta la notte. L'assorbanza o densità ottica è stata letta a 570 nm con uno spettrofotometro Ascent Multiscan (Titertek Instruments Inc., Huntsville, Alabama, USA).

3.4 Vitalità cellulare

Per confermare i risultati del saggio MTT, abbiamo utilizzato un test di bioluminescenza per la vitalità cellulare (CellTiter Glo, Promega, Milano, Italia). Questo test permette di determinare il numero di cellule vitali in coltura attraverso la quantificazione di ATP presente, in quanto l'ATP si correla alla presenza di cellule metabolicamente attive. Il test consiste nella lisi cellulare e nella generazione di un segnale luminescente proporzionale alla quantità di ATP presente, che a sua volta è direttamente proporzionale al numero di cellule presenti nella coltura. Il CellTiter Glo® Assay si basa sulla proprietà di una luciferasi termostabile (Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase), di generare un segnale luminescente stabile.

Per eseguire questo test, le cellule C2C12 sono state lavate in una fiasca di coltura con PBS e trattate con 4 ml di tripsin-EDTA (EuroClone) per 8 minuti a 37°C in atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Le cellule sono state sospese in 6 ml di DMEM contenente il 5% di siero fetale bovino e quindi centrifugate. Il surnatante è stato scartato e le cellule sono state risospese in un terreno contenente il 5% di siero fetale bovino e poi piastrate su superfici lisce o SLA alla densità di 30.000 cellule / pozzetto in 500µl di terreno completo e trattate con 1 µl di PBS o 1 µl di H₂O₂ (0,1 mM).

Dopo il periodo di stimolazione di 1 o 4 ore, sono stati scartati 400 µl di terreno e un volume di

Cell-Titer Glo Reagent® è stato aggiunto ad un uguale volume di terreno di coltura cellulare presenti in ogni pozzetto (100 µl di Reagente di Lisi è stato aggiunto a 100 µl di terreno contenente cellule di coltura). I campioni sono stati miscelati per 2 minuti per indurre la lisi cellulare e quindi la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti, in modo da stabilizzare il segnale luminescente. I campioni sono stati agitati e poi sono stati letti con un Glomax 20/20 Luminometer (Promega) con iniettori doppi.

3.5 Luciferase-reporter assay

Protocollo di Trasfezione

E' stato applicato il protocollo del kit "Dual-Luciferase Reporter Assay System" (Promega). Questo sistema quantifica l'attività del gene reporter luciferasi "Firefly". Il plasmide pRL codifica per la luciferasi di Renilla, la quale emette luminescenza utilizzando un substrato differente da quello della luciferasi di Lucciola: lo stesso campione può essere utilizzato quindi per le misure dell'attività di entrambi gli enzimi.

Il valore finale considerato nei nostri esperimenti corrisponde al rapporto del valore di luminescenza della luciferasi di Lucciola rispetto a quello della luciferasi di Renilla.

Il fattore di trascrizione inducibile codifica per il gene reporter della luciferasi "lucciola" sotto il controllo di un elemento promotore (TATA box) congiunto a degli specifici elementi regolatori che si legano a TCF o FoxO. Questi fattori segnalano sia l'aumento che la diminuzione dell'attività della via di segnalazione Wnt canonica e della via di segnalazione PI3a/Akt. La luciferasi "Firefly" funziona come reporter genico. L'enzima catalizza la trasformazione del proprio substrato di D-luciferina in ossiluciferina, un processo che richiede ossigeno, Mg^{++} e ATP, con conseguente emissione di fotoni. La luciferasi di Renilla allo stesso modo, innesca l'ossidazione della

Celenterati-luciferina, generando un "flash" di luce.

SureFECT™ (SABiosciences) è un reagente che è stato utilizzato per transfettare transitoriamente le cellule con i fattori reporter.

Per preparare i costrutti per la trasfezione, 50 µl / pozzetto di terreno di coltura Opti-MEM privo di siero è stato posto in provette di polistirene e poi sono stati aggiunti 250 ng / pozzetto di reporter (β-catenin/TCF-Luc o FoxO-Luc, 100 ng / µl) e 250 ng / pozzetto di plasmide che esprime il gene d'interesse (β-catenina, Wnt3a o dnTCF) o 1 µl di proteine in forma solubile. Ogni miscela di trasfezione è stata mescolata delicatamente.

Successivamente 1,6 µl / pozzetto di SureFECT™ è stato diluito in 50 microlitri / pozzetto di Opti-MEM in provette e poi mescolato con delicatezza e incubato a temperatura ambiente per 5 minuti.

Dopo l'incubazione, 50 µl di SurFect diluito® sono stati distribuiti in provette (di cui al punto 1) contenenti il costrutto diluito (rapporto 1:1), mescolati delicatamente e incubati a temperatura ambiente per 20 minuti.

Dopo il periodo di incubazione, 100 µl del complesso specifico di trasfezione sono stati aggiunti ai pozzetti contenenti dischi in titanio liscio o SLA.

Nel frattempo le cellule della linea C2C12 o MCT3T sono state lavate con PBS e trattate con 4 ml di tripsina-EDTA (EuroClone) per 4 minuti a 37 ° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Le cellule sono state sospese in 6 ml di Opti-MEM contenente il 5% di siero fetale bovino e quindi centrifugate. Il surnatante è stato scartato e le cellule sono state risospese in Opti-MEM, contate con la metodica del reticolo della camera di Burker e poi ridisposte su una piastra in 0,5 ml / pozzetto di Opti-MEM (Invitrogen, San Giuliano Milanese, MI, Italia), integrati da 5% FBS, 1% Penstrep, alla densità di 125.000 cellule / pozzetto sulle superfici in titanio ognuna contenente complessi SurFECT.

Per gli esperimenti di stress ossidativo, le cellule sono state stimulate con 1 µl di PBS o 1 µl di H₂O₂ (0,1 mM), per 4 ore dopo la trasfezione.

Le trasfezioni sono state effettuate in triplicato per ognuna delle condizioni testate.

Luciferase reporter assay

Le cellule sono state raccolte 24 ore dopo la trasfezione e l'attività della luciferasi è stata determinata da estratti cellulari utilizzando il saggio Dual-Luciferase Reporter (Promega). In questo test le attività di Firefly e Renilla luciferasi sono state misurate in sequenza in un singolo campione.

In primo luogo, il terreno di coltura è stato rimosso dalle cellule e un sufficiente volume di PBS è stato aggiunto per lavare le superfici in titanio. Poi, 100 µl di Passive Lysis Buffer (PLB), diluito in H₂O (1:5), sono stati aggiunti per coprire lo strato di cellule e la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 15 minuti.

In seguito 20 µl di lisato cellulare sono stati trasferiti da ogni pozzetto in provette luminometriche e l'attività del reporter luciferase di Firefly è stata misurata aggiungendo 100 µl di Luciferase Reagent (LAR II). Il contenuto è stato miscelato 2 o 3 volte con la pipetta ed è stato letto con Glomax 20/20 Luminometer (Promega). Dopo la quantificazione della luminescenza di lucciola, la provetta è stata rimossa dal luminometro e 100 µl del reagente Stop & Glo sono stati aggiunti alla stessa provetta. Dopo la centrifugazione, è stata effettuata una seconda misura per leggere il segnale di Renilla. L'attività della luciferasi è stata calcolata come rapporto tra la luminescenza della luciferasi di Firefly rispetto a quello della luciferasi di Renilla.

Costrutti

I costrutti TCF-Luc e FoxO-Luc utilizzati per la trasfezione sono stati acquistati da SABioscience (Frederick, MD, USA). La β -catenina (ID 16.518), i plasmidi Wnt3a (ID 12.518) e dnTCF4 (ID19284) sono stati ottenuti da AddGene public repository (Cambridge, MA, USA).

3.6 L'espressione di geni osteogenici

Per determinare l'espressione di mRNA specifico per l'attività osteogenica degli osteoblasti, l'RNA totale è stato isolato dalle cellule usando TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen). Copie di DNA complementare a singolo filamento (cDNA) sono state sintetizzate da 1-3 µg di RNA totale usando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e poi analizzate con un metodo quantitativo Real Time PCR usando sonde TaqMan.

Il test è stato effettuato utilizzando le seguenti sonde ottenute da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): Axin2 (Mm01265783_m1), fosfatasi alcalina (Mm00475834_m1); osteoprotegerina (Mm00435451_m1); Wisp-2 (Mm00497471_m1); connexin 43 (Mm00439105_m1); cicloossigenasi-2 (Mm01307329_m1); β-catenina (Mm00483039_m1); Snail (Mm01249564_g1); MnSOD (Mm01313000_m1); catalasi (Mm00437992_m1); Gadd45 (Mm00432802_m1), osteocalcina (per 5'-GCTGCGCTCTGTCTCTCTGA-3'; rev 5' TGCTTGGACATGAAGGCTTTG-3', 5'-sonda FAM-AAGCCCAGCGGCC-NFQ-3'); housekeeping gene, mouse ribosomal protein S2, ChoB (per 5'-CCCAGGATGGCGACGAT-3', 5'-CCGAATGCTGTAATGGCGTAT-3'; sonda, 5'-FAMTCCAGAGCAGGATCC-NFQ-3').

L'isolamento dell'RNA

Per l'espressione genica, 100.000 cellule C2C12 o MC3T3 sono state disposte su dischi in titanio lucidato o SLA in 1 ml di terreno completo in pozzetti da 24 (Euroclone), e stimolati con PBS o H₂O₂ e con una forma solubile di Wnt3a o β-catenina. Ventiquattro ore dopo, il terreno di coltura è stato scartato dai pozzetti e il lisato cellulare è stato direttamente analizzato in dischi di coltura aggiungendo 1 ml di TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) per ogni pozzetto. La soluzione è stata vigorosamente mescolata con pipetta in modo da indurre la lisi delle cellule, e infine il campione omogeneizzato è stato trasferito in provette RNasi-free e incubato per 5 minuti a 4 ° C per consentire la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine.

Per la fase di separazione, 0,2 ml di cloroformio (per 1 ml di Reagente TRIZOL[®]) sono stati aggiunti alle provette. I campioni sono stati agitati vigorosamente per 10 secondi e centrifugati a 13.000 x g per 15 minuti. Dopo la centrifugazione, la miscela risultava separata in una fase rossa, una del fenolo-cloroformio, contenente proteine e lipidi, un' interfase di DNA ed una fase incolore acquosa. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa (Fig.6).

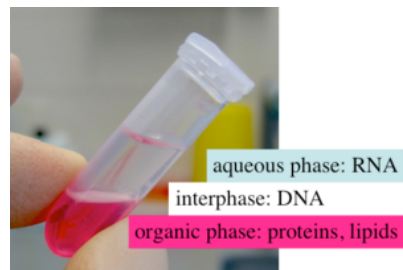


Figura 6. Diverse fasi nella provetta.

La fase acquosa è stata accuratamente trasferita in una nuova provetta senza disturbare l'interfase. Per far precipitare l'RNA dalla fase acquosa, sono stati aggiunti 0,5 ml di alcool isopropilico (per 1 ml di reagente TRIZOL). I campioni sono stati incubati a -4 ° C per 10 minuti e centrifugati a 13.000 g per 15 minuti. Il precipitato di RNA, invisibile prima della centrifugazione, forma un pellet gelatinoso sui lati e sul fondo della provetta. Al fine di eliminare completamente il surnatante, il pellet di RNA è stato lavato due volte con 1 ml di etanolo al 75% (per 1 ml di Reagente TRIZOL). I campioni sono stati mescolati centrifugati a 7500 x g per 5 minuti.

Infine, l'RNA è stato diluito in acqua trattata con DEPC al fine di rimuovere DNAsi e RNAsi (15-20 microlitri) e la quantificazione dell' RNA è stata effettuata utilizzando NanoDrop, considerando la densità ottica a 260 nm e 280 nm per determinare la concentrazione e la purezza del campione.

Sintesi del cDNA e Real Time PCR

La sintesi di cDNA a singolo filamento dall' RNA è il primo passo nel processo di RT-PCR.

I componenti del kit sono stati scongelati e la RT 2X Master Mix è stata preparata con l'aggiunta dei seguenti reagenti: 5µl RT buffer 10X, 2µl 25X 2µl dNTP Mix (100mm), 5µl 10X Random Primers, 2.5 µl trascrittasi inversa MultiScribe™ e 10.5 µl nucleasi-free H₂O.

Per preparare la reazione di retro trascrizione di cDNA, 1-3 µg di RNA totale sono stati diluiti in 25 µl di acqua RNase-free in provette RNAsi-free e quindi 25µl di RT 2X Master Mix sono stati pipettati in ogni provetta di reazione fino ad un volume finale di 50µl. I campioni sono stati brevemente centrifugati e incubati a 25°C per 10 minuti e poi messi a 37°C per 120 minuti per eseguire la sintesi del cDNA.

L'amplificazione del DNA target, utilizzando come template il cDNA ottenuto, è il secondo passo nel processo di RT-PCR. In questa fase la DNA polimerasi (dal TaqMan Gene Expression Master Mix) amplifica il cDNA target sintetizzato dal campione di RNA, utilizzando una sequenza primer specifica e una sonda TaqMan.

Come funziona TaqMan:

La PCR può amplificare una piccola quantità di DNA stampo (o RNA) in grandi quantità in un paio d'ore. Questa operazione viene eseguita miscelando il DNA con dei primer che riconoscono sequenze specifiche su entrambi i lati del DNA (avanti e indietro), Taq polimerasi (della specie *Thermus aquaticus*, la cui polimerasi è in grado di resistere a temperature estremamente elevate), nucleotidi (dNTPs per il DNA, NTP per RNA) e un buffer di reazione. La temperatura viene poi alternata tra fasi calde e fredde per separare i filamenti di DNA e permetterne il successivo annealing, mentre la polimerasi aggiunge nuovi elementi complementari ad ogni ciclo. La metodica "Real-Time PCR" permette di visualizzare l'aumento della quantità di DNA, in quanto viene amplificata attraverso le tecnologie TaqMan (Fig.7)

L'attività della nucleasi sfrutta la reazione di PCR 5' della DNA polimerasi (AmpliTaq® Gold) per il clivaggio di una sonda TaqMan® durante la PCR. Le sonde TaqMan MGB® sono costituite da

un oligonucleotide specifico con un colorante reporter (marker 6FAM™) legato all'estremità 5' della sonda, un quencher non fluorescente (NFQ) al terminale 3' della sonda, che offre il vantaggio di un basso segnale di fondo con conseguente migliore precisione nella quantificazione.

Durante la reazione, il clivaggio della sonda separa il colorante reporter e il colorante quencher, con un conseguente aumento della fluorescenza del reporter. L'accumulo di prodotti di PCR viene rilevato direttamente monitorando l'aumento di fluorescenza del colorante reporter.

Mentre la sonda è collegata o non collegata al DNA template e prima che la polimerasi agisca, il quencher (Q) fluoroforo riduce la fluorescenza del reporter (R) fluoroforo attraverso il trasferimento

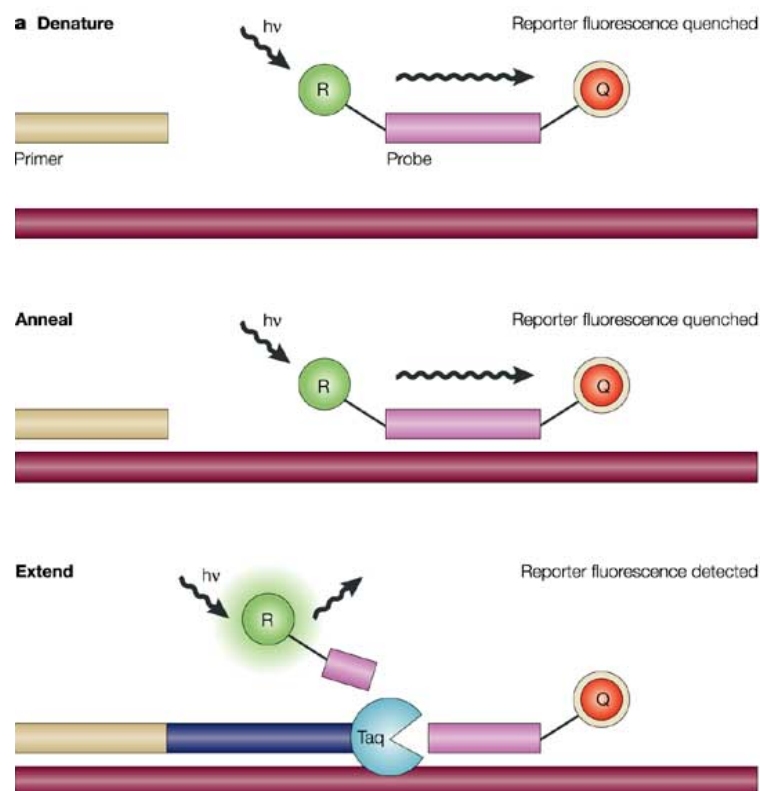


Figura 7. Il principio di funzionamento della sonda TaqMan si basa sull'attività nucleasica 5'–3' della Taq polimerasi per clivare una sonda con doppia marcatura durante l'ibridizzazione alla sequenza target complementare e misurarne l'emissione di fluorescenza. Come in altri metodi di Real Time PCR, il segnale fluorescente risultante permette la misurazione quantitativa dell'accumulo del prodotto durante la fase esponenziale della PCR

di energia Förster-type (Förster, 1948; Lakowicz, 1983). Durante la PCR, una volta che la sonda TaqMan ® si è legata con la parte specifica del DNA template dopo la denaturazione (alta temperatura) e la reazione si è raffreddata, i primer si legano al DNA.

La Taq polimerasi infine aggiunge nucleotidi e rimuove la sonda TaqMan ® dal DNA stampo. Questo separa il quencher dal reporter e permette al reporter di sprigionare la sua energia. Questo processo è quindi quantificato utilizzando un computer. I frammenti della sonda sono poi spostati dal target e la polimerizzazione del filamento continua. Più volte avviene la denaturazione e l'annealing più opportunità ci sono per la sonda TaqMan di legare e di conseguenza la luce emessa è rilevata di più se il target d'interesse è presente e la sonda si lega specificamente al target. L'aumento del segnale di fluorescenza è rilevato solo se la sequenza bersaglio è complementare alla sonda e se è amplificato durante la PCR. A causa di questi requisiti, l'amplificazione aspecifica non viene rilevata.

I kit TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) forniscono un mix per la PCR che contiene AmpliTaq Gold ® DNA polimerasi, UP (Ultra Pure), l'uracile-DNA Glycosylase (UDG), deossiribonucleotide trifosfati (dNTPs) con trifosfato deossiuridina (dUTP), ROX TM passive reference e componenti buffer.

Per preparare la miscela dei componenti della reazione PCR, sono stati mescolati i seguenti reagenti in provette RNase-free: 10 µl di TaqMan Gene Expression MasterMix 2X, 1 ml di sonda TaqMan e 9 µl di cDNA (1:10 diluito in acqua trattata con DEPC), per un volume finale di 20 µl per reazione. Le provette sono state poi ricoperte e vortexate brevemente per miscelare le soluzioni. Sono state anche brevemente centrifugate per eliminare le eventuali bolle d'aria dalla soluzione. La qPCR è stata effettuata con una macchina Real Time PCR (iCycler, Bio-Rad).

E' stato inserito nello strumento il piatto di reazione e sono state impostate le condizioni dei cicli termici come segue: 2 minuti a 50 ° C, 10 minuti a 95 ° C, necessari per attivare l'enzima AmpliTaq

Gold e 40 cicli di PCR composti da 15 secondi a 95°C per il processo di denaturazione e 1 minuto a 60°C per i passaggi di annealing/extension.

3.7 Analisi Statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando Prism 4 (GraphPad, La Jolla, CA). Tutti i valori sono riportati come media \pm deviazione standard di tre esperimenti ripetuti in triplicato. Le differenze tra le medie di ogni gruppo è stata valutata con test statistici ANOVA applicando la correzione di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative quando $p < 0,05$.

4. RISULTATI

4.1 La via di segnalazione Wnt è up-regolata nelle cellule mesenchimali che crescono su superfici ruvide

E' stata utilizzata la linea cellulare C2C12 per valutare se la trascrizione mediata dalla β -catenina fosse rafforzata quando le cellule mesenchimali erano coltivate su una piastra in titanio con una topografia ruvida.

Le cellule sono state piastrate su superfici in titanio liscio o SLA e sono state transitoriamente trasfettate con un costrutto reporter che esprimeva la *firefly luciferase* sotto il controllo di un elemento responsivo al complesso / TCF (TCF-Luc). I livelli basali dell'attività della luciferasi erano leggermente, ma significativamente, più elevati su superfici SLA per le cellule non trasfettate o in cellule trasfettate con il vettore vuoto. Tuttavia, quando le cellule sono state co-trasfettate con β -catenina wild-type o Wnt3a, C2C12 ha mostrato un marcato aumento dei livelli di attività della luciferasi su entrambe le superfici. Questo indica una up-regulation della via canonica di Wnt. Inoltre, la trascrizione mediata da β -catenina /TCF risultava significativamente più alta nelle cellule in crescita su superfici ruvide rispetto alle superfici lisce (Fig. 8).

Queste osservazioni sono state dimostrate anche con un modello diverso di cellule mesenchimali. Le cellule osteoblastiche murine della linea MC3T3 sono state piastrate su un disco in titanio liscio o ruvido e trasfettate con reporter TCF-Luc e β -catenina wild-type o un vettore vuoto. L'attività basale della Luciferasi in cellule trasfettate con il vettore vuoto era trascurabile e pari a quella di un vettore reporter negativo di controllo, ma l'attività TCF-Luc era maggiore nelle cellule in crescita su superfici SLA dopo trasfezione con β -catenina wild-type (Fig. 9).

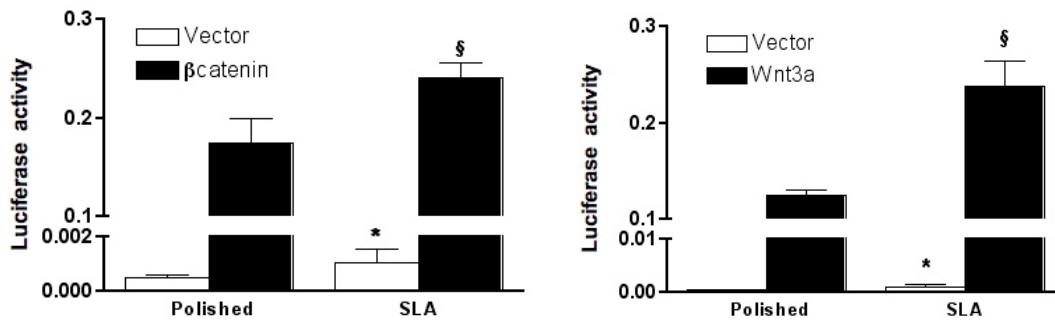


Figura 8. A-B) Attività luciferasica di cellule C2C12 coltivate su superfici di titanio lisce (Polished) or ruvide (SLA) e transfettate con un vettore vuoto o con A) WT β catenina, B) Wnt3a. Le cellule sono state transfettate con un costrutto reporter esprimente firefly luciferase sotto il controllo di siti di legame per β catenina/TCF. * $p < 0.05$ vs C2C12 transfettate con vettore su superfici Polished; § $p < 0.05$ vs C2C12 transfettate con β catenina or Wnt3a su superfici Polished.

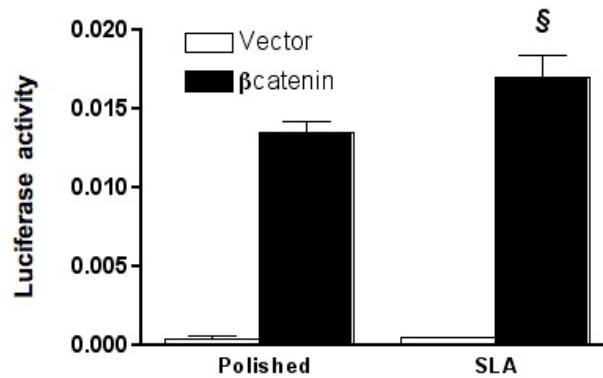


Figura 9. Attività luciferasica di cellule MC3T3 su superfici Polished o SLA, transfettate con un vettore vuoto o con WT β catenina. § $p < 0.05$ vs MC3T3 transfettate con β catenina su superfici Polished.

4.2 L'up-regolazione di Wnt determinata dalle superfici ruvide è mediata dai meccanismi di controllo della degradazione di β -catenina

I modelli attuali prevedono che la β -catenina funzioni nella via di segnalazione Wnt mediante l'attivazione dei geni target Tcf / Lef e che la sua abbondanza sia regolata dalle proteine poliposi adenomatosa coli (APC) e dalla glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK3 β) (Kolligs et al, 1999). Per spiegare l'ipotesi che il degrado della β catenina proteosomiale abbia il controllo del segnale di Wnt le cellule C2C12 sono state transitoriamente trasfettate con un vettore vuoto o una β -catenina mutante costitutivamente attiva (S33Y) contenente una mutazione nonsense della tirosina con la serina al codone 33 e conseguentemente insensibile alla fosforilazione mediata da GSK3-Axin e alla degradazione proteosomiale (Kolligs, Hu et al. 1999). Anche se la trasfezione della β -catenina S33Y era ampiamente aumentata dalla trascrizione β -catenina / TCF, non è stata osservata nessuna differenza significativa tra i diversi trattamenti di superficie (Fig. 10).



Figura 10: Attività luciferasica di cellule C2C12 coltivate su superfici di titanio Polished o SLA e transfettate con un vettore vuoto o un S33Y di β catenina. * $p < 0.05$ vs C2C12 transfettate con un vettore vuoto su superfici Polished.

4.3 La stimolazione dei geni bersaglio Wnt/ β -catenina è up-regolata nelle cellule su superfici ruvide

Stabilito che le cellule che crescono su superfici ruvide mostrano una up-regolazione della via Wnt/ β -catenina dipendente, si è proceduto ad indagare l'attivazione della via di segnalazione Wnt / β -catenina a livello dell' mRNA, misurando l'espressione di geni target conosciuti per la β -catenina in cellule C2C12 su superfici lisce o ruvide, dopo trasfezione con un vettore vuoto o con il gene Wnt3a. La sovraespressione di Wnt3a ha stimolato l'espressione di geni target di Wnt fosfatasi alcalina (ALP), osteoprotegerina (OPG), Wisp2, Connexin 43 (Cx43) and Cyclooxygenase 2 (Cox-2), 24 ore dopo la trasfezione (Fig. 11).

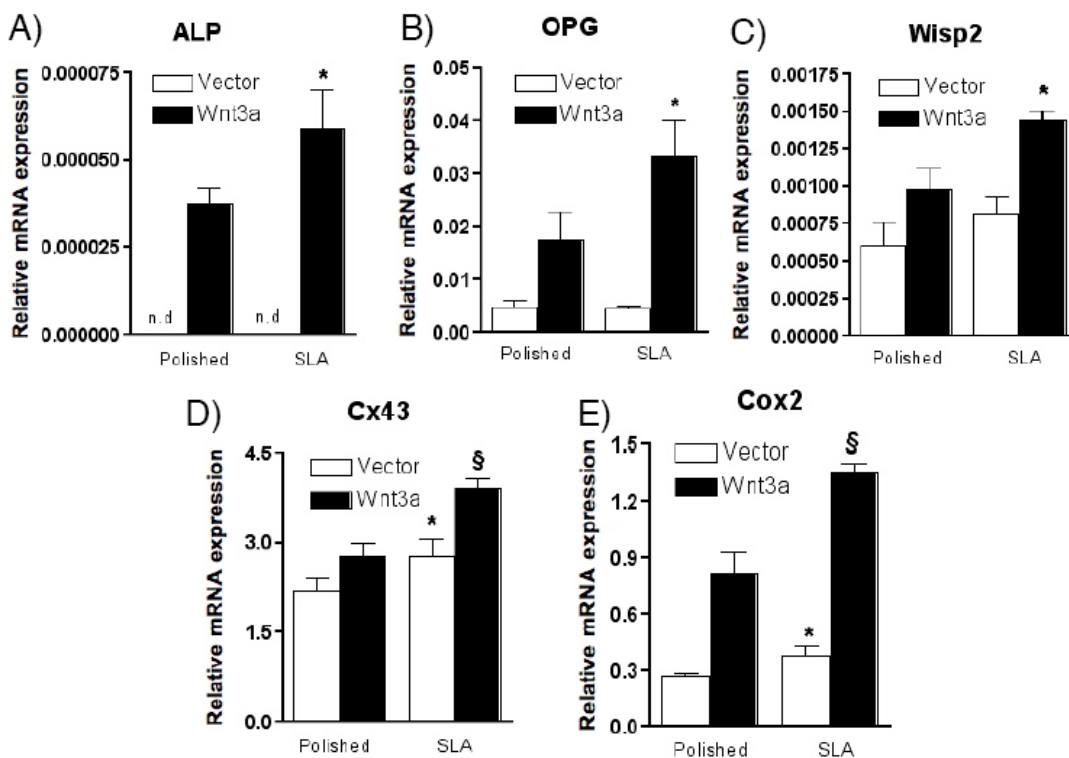


Figura 11. RT-PCR quantitativa di mRNA per Alkaline Phosphatase (ALP), Osteoprotegerina (OPG), WISP- 2 , Connexin 43 (Cx43) and Cyclooxygenase 2 (Cox-2) da cellule C2C12 coltivate su superfici di titanio Polished o SLA dopo trasfezione con un vettore vuoto o contenente Wnt3a. Tutti i valori sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato. A-C)* $p < 0.05$ vs cellule su superfici Polished; D, E) * $p < 0.05$ vs cellule transfettate con vettor su superfici Polished. § $p < 0.05$ vs cellule transfettate con Wnt3a su superfici Polished.

È importante sottolineare che le cellule su superfici SLA hanno mostrato una maggiore espressione dei geni ALP, OPG, Wisp, Cx43 e Cox-2 a seguito di trasfezione di Wnt3a rispetto alle cellule su superfici lisce. Inoltre, l'espressione dei geni target di Wnt target e dei geni della risposta allo stress Cx43 e Cox-2 è stata maggiore nelle cellule su superfici ruvide già ad un livello basale (Fig. 11 D, E).

4.4 La topografia di superficie diminuisce l'espressione di Axin 2 ma non influenza i livelli di mRNA della β -catenina

I livelli di trascrizione della β -catenina sono stati quindi misurati per vedere se la topografia superficiale poteva aumentare la via canonica di segnalazione Wnt aumentando i livelli di β -catenina rendendola così più disponibile per i processi di trascrizione e trasduzione. Tuttavia, i livelli di mRNA della β -catenina non sono stati influenzati dalla topografia di superficie, sia a livello basale sia dopo la trasfezione di Wnt3a (Fig. 12).

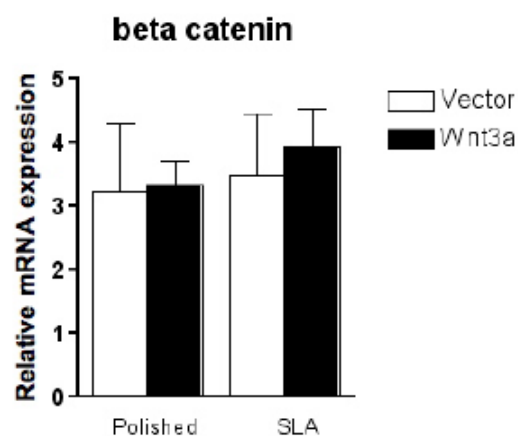


Figura 12. RT-PCR quantitativa di mRNA per β catenina da cellule C2C12 coltivate su superfici Polished o SLA dopo trasfezione con un vettore vuoto o Wnt3a. Tutti i valori sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato.

Abbiamo valutato l'espressione di Axin 2/Axil/Conductin, un omologo di Axin 1 e una componente del complesso molecolare che ha come bersaglio la degradazione della β -catenina. Axin 1 e 2 sono geni bersaglio β -catenina e quindi Axin 2 è stato, come previsto, up-regolato dalla sovraespressione di Wnt3a su entrambe le superfici, ma i suoi livelli erano più bassi su superfici ruvide che sulle superfici lisce (Fig. 13). Inoltre, abbiamo osservato un aumento dei livelli basali di Snail 1 mRNA, un gene noto per migliorare la via di segnalazione Wnt (Stemmer, de Craene et al. 2008), su superfici ruvide (Fig. 13).

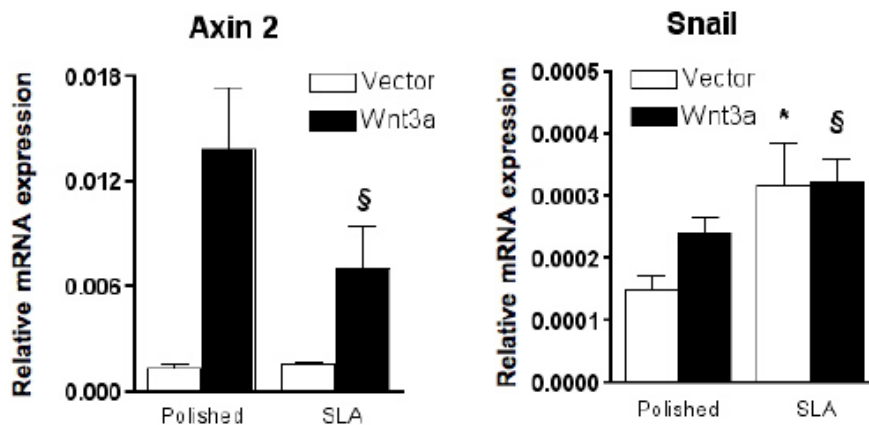


Figura 13. RT-PCR quantitativa di mRNA per Axin 2, and Snail 1 da cellule C2C12 coltivate su superfici Polished o SLA dopo transfezione con un vettore vuoto o Wnt3a. Tutti i valori sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato. * $p < 0.05$ vs cellule transfettate con vettore su superfici Polished. § $p < 0.05$ vs cellule transfettate con Wnt3a su superfici Polished

4.5 Le superfici ruvide promuovono l'espressione di osteocalcina, ma l'inibizione della β -catenina/TCF abolisce l'effetto della topografia sulla differenziamento delle cellule

Per studiare gli effetti della via di segnalazione Wnt sulla differenziamento osteoblastica sul titanio liscio o ruvido, abbiamo seminato la linea cellulare osteoblastica MC3T3 su titanio liscio o ruvido, in presenza di acido ascorbico, per indurre l'espressione di marcatori osteoblastici. Rispetto alle cellule su superfici lucide, le celle su superfici SLA, al 3 ° giorno dopo la semina, esprimevano livelli più elevati di osteocalcina, una proteina extracellulare che viene prodotta esclusivamente da questo fenotipo a livello dell'mRNA.

Tuttavia, l'inibizione della segnalazione da parte β -catenin/TCF attraverso la transfezione con una isoforma dominante negativa di TCF, in grado di legarsi a β -catenina, ma non in grado di iniziare la trascrizione, ha abolito la differenza esistente tra i livelli di trascrizione tra superfici lisce e SLA (Fig. 14).

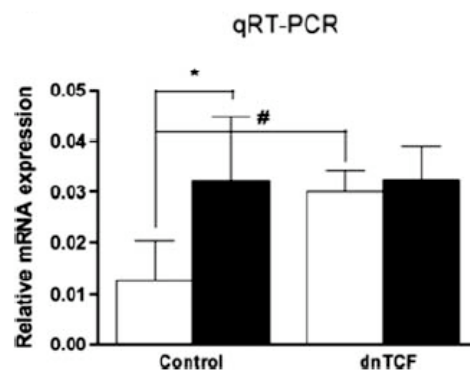


Figura 14. Livelli di osteocalcina da cellule coltivate su superfici Polished o SLA dopo transfezione con vettore vuoto o dominant negative TCF (dnTCF) determinato tramite quantitative RT-PCR. Tutti i valori sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato. * $p < 0.05$ vs cellule transfettate con un vettore su superfici Polished. # $p < 0.05$ vs cellule transfettate con un vettore su superfici Polished.

4.6 L'aggiunta di H₂O₂ alle superfici in titanio genera una quantità equivalente di specie ROS

Sono stati studiati gli effetti della topografia delle superfici nel controllo della trascrizione FoxO-mediata in presenza o in assenza di stress ossidativo.

Per capire se i livelli di ROS generati dall'H₂O₂ nel medium potevano essere influenzati dalle caratteristiche della superficie in titanio in modo indipendente delle difese cellulari, il disco di titanio liscio e quello SLA sono stati posti su piastre da 24 pozzetti in DMEM completo integrato da 2,5 mM di Acido ascorbico (AA) e poi è stata aggiunta H₂O₂ 0,1 mM e sono stati misurati livelli di ROS.

In letteratura è riportato che AA può ridurre l'MTT a formazano in assenza di cellule viventi e che l'ossidazione di acido ascorbico dovuta alla presenza di H₂O₂ distrugge la sua capacità di ridurre MTT (Chakrabarti et al, 2000). Sulla base di questo principio è stato creato un metodo per misurare il livello di ROS nel medium che consiste in un segnale di fondo che può essere rilevato dallo spettrofotometro. In coerenza con la relazione Chakrabarti, l'aggiunta di H₂O₂ antagonizza la riduzione di MTT a formazano in modo dose-dipendente, generando specie reattive dell'ossigeno con una forte attività ossidativa, innalzando in modo significativo la riduzione di formazano in entrambe le superfici lisce e SLA. Tuttavia, nessuna differenza è stata rilevata tra i livelli di capacità di assorbimento sulla superficie lucida o SLA dopo l'aggiunta di H₂O₂, indicando che il trattamento di superficie non ha influenzato il livello generale ossidativo in presenza di perossido di idrogeno (Fig.15).

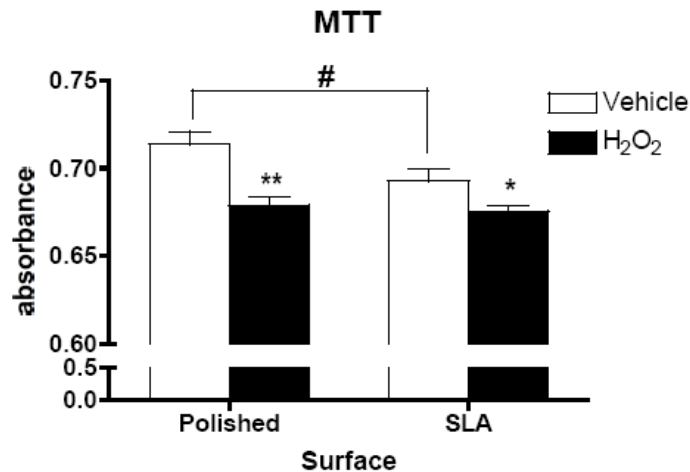


Figura 15. MTT assay su superfici lisce (Polished) o ruvide (SLA) in assenza o in presenza di 0.1 mM H₂O₂ senza cellule. *p<0.05 vs superficie in presenza di controllo, **p<0.01 versus controllo.

4.7 Le cellule in crescita su superfici ruvide sono meno sensibili allo stress ossidativo

Per determinare come la topografia del substrato influenzi il comportamento delle cellule mesenchimali in presenza di stress ossidativo, cellule mesenchimali C2C12 sono state coltivate su superfici di titanio liscio o SLA e poi è stata indotta la produzione di ROS con l'aggiunta di H₂O₂ 0,1 mM al supernatante. Come previsto, la vitalità cellulare, misurata mediante il test MTT è scesa di circa il 50% in cellule su superfici di plastica (dati non riportati) o superfici lisce in titanio dopo 24 ore. La vitalità sulle superfici SLA però è stata ridotta del 25%, un risultato significativamente diverso dalle superfici lisce (Fig. 16).

Per confermare questi risultati, la vitalità cellulare è stata valutata anche misurando il contenuto di ATP nelle cellule, con un saggio basato sulla bioluminescenza. Abbiamo testato la vitalità cellulare dopo 1 e 4 ore dall'aggiunta di H₂O₂. In entrambe le misurazioni l'H₂O₂ aveva ridotto la vitalità cellulare sulle superfici lisce e le cellule C2C12 coltivate su superfici SLA sembravano essere

protette dallo stress ossidativo. Non è stata osservata però una differenza significativa rispetto al gruppo controllo (Fig. 17).

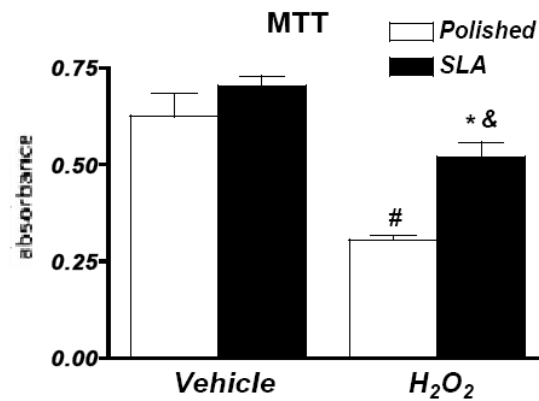


Figura 16: MTT assay su cellule C2C12 su superfici Polished o SLA surfaces in assenza o in presenza di 0.1 mM H₂O₂. *p<0.001 versus superfici Polished trattate con H₂O₂, #p<0.001 versus superfici Polished di controllo, &p<0.01 versus superfici SLA di controllo.

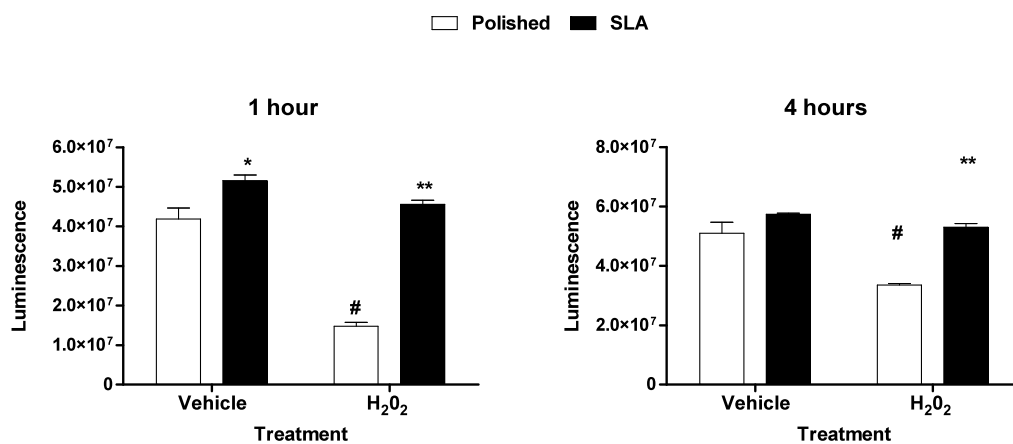


Figura 17. Bioluminescence viability assay su cellule C2C12 su superfici Polished o SLA in assenza o in presenza di 0.1 mM H₂O₂ dopo 1 o 4 ore. *=p<0.05 versus superfici Polished di controllo, #=p<0.001 superfici Polished di controllo, **=p<0.001 vs. superfici Polished in presenza di H₂O₂.

4.8 L'attività trascrizionale di FoxO è maggiore nelle cellule che crescono su superfici ruvide

Per studiare l'ipotesi che nelle cellule coltivate su superfici ruvide la via di FoxO è up-regolata e resiste meglio allo stress ossidativo, è stato utilizzato un sistema reporter per seguire l'attività trascrizionale FoxO.

Le cellule C2C12 sono state trasfettate con un costrutto reporter che nasconde un elemento sensibile che si lega a FoxO e guida l'espressione di Firefly Luciferase in presenza o in assenza di H₂O₂ 0,1 mM e un vettore di controllo che porta una gene espresso costitutivamente da Renilla luciferasi.

E' stata osservata una differenza significativa tra i gruppi trattati con veicolo o H₂O₂.

Inoltre, l'attività di FoxO-Luc è stata maggiore nelle cellule C2C12 cresciute su superfici SLA rispetto al controllo (Fig.18).

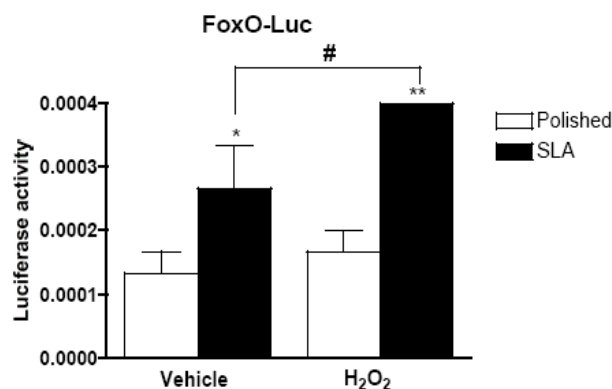


Figura 18. Attività Luciferasica di cellule C2C12 su superfici Polished o SLA e transfettate con un reporter construct esprimente firefly luciferase sotto il controllo di siti di legame per β catenina/FoxO e trattate con vehicle o 0.1 mM H₂O₂. a= $p < 0.05$ e b= $p < 0.001$ versus cellule su superfici Polished e $p < 0.05$ versus cellule su SLA trattate con H₂O₂.

4.9 Le cellule in crescita su superfici ruvide esprimono alti livelli di geni target FoxO

Le cellule C2C12 sono state disposte su piastre di titanio liscio o ruvido e poi stimolate con 0.1 mM H₂O₂ ed è stata analizzata l'espressione di geni target FoxO dopo 24 ore. I livelli di mRNA della *catalasi*, un enzima che si oppone a ROS con la conversione di H₂O₂ in acqua, erano significativamente più alti nelle cellule sulla superficie SLA che nelle cellule sulla superficie liscia già ad un livello basale. Dopo l'aggiunta di H₂O₂ l'espressione di catalasi aumentava su entrambe le superfici, liscia e SLA, ma la differenza tra i due gruppi era stata mantenuta. Allo stesso modo, l'espressione di manganese superossido dismutasi (MnSOD) era più alta su superfici ruvide ed era accresciuta con lo stress ossidativo in entrambi i gruppi, ma è rimasto superiore sulle superfici SLA. I livelli di Gadd45, un gene coinvolto nella riparazione dei danni al DNA, erano superiori su superfici SLA a livelli basali. L'aggiunta di H₂O₂ aumentava i livelli di mRNA su superfici lisce e non è stata osservata nessuna differenza nell'espressione di questo gene tra i gruppi (Fig.19).

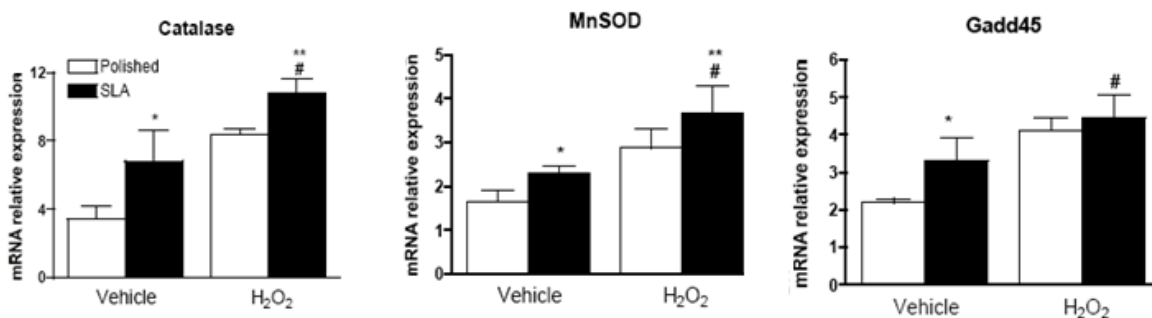


Figura 19. Quantitative RT-PCR di mRNA per Catalase, Superoxide Dismutase (MnSOD) e Gadd45 da cellule C2C12 coltivate su superfici Polished o SLA dopo trattamento con Vehicle o 0.1 mM H₂O₂. Tutti i valori sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato. * p < 0.05 versus cellule su superfici Polished, # p < 0.05 versus cellule su SLA di controllo.

4.10 Lo stress ossidativo inibisce la via di segnalazione canonica di Wnt

Abbiamo poi transfettato cellule C2C12 cresciute su titanio liscio o ruvido con Wnt3a, un membro della famiglia Wnt che innesca l'attivazione della via di segnalazione canonica e il sistema reporter TCF-Luc, tra cui un costrutto reporter che esprime Firefly Luciferasi sotto il controllo dei siti di legame TCF, per valutare l'attività trascrizionale della β -catenina / TCF e di Renilla Luciferasi.

Come descritto in letteratura (Almeida 2007), l'attività di TCF-Luc è maggiore nelle cellule coltivate su superfici ruvide, tuttavia, abbiamo osservato una forte diminuzione della trascrizione β -catenina / TCF-mediata dopo l'aggiunta di H₂O₂. Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi. Questo fenomeno è stato descritto in precedenza ed è stato dimostrato che in condizioni di stress ossidativo la β -catenina è deviato verso FoxO per contrastare la produzione di ROS. Di conseguenza, l'espressione del gene bersaglio osteoprotegerina Wnt (OPG) è diminuita in cellule in crescita su superfici SLA (Fig. 20).

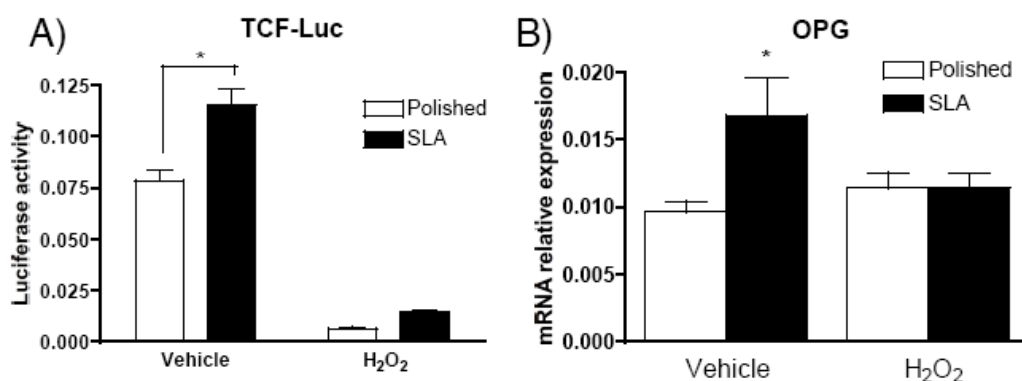


Figura 20. A) Luciferase activity di cellule C2C12 coltivate su superfici Polished o SLA e transfettate con Wnt3a. Le cellule sono state transfettate con Wnt3a e un reporter construct esprimente firefly luciferase sotto il controllo di siti di legame multipli per β catenina/TCF e sono state trattate con vehicle o 0.1 mM H₂O₂. * p<0.05 vs C2C12 su superfici Polished. B) Quantitative RT-PCR per osteoprotegerina (OPG) da cellule C2C12 coltivate su superfici Polished o SLA dopo transfezione con Wnt3a e trattate con vehicle o 0.1 mM H₂O₂. Tutti i valori sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato. *=p<0.05 versus cellule su superfici Polished.

5. DISCUSSIONE

La topografia di superficie dell'impianto gioca un ruolo centrale nel modulare il comportamento delle cellule a livello dell'interfaccia osso-impianto. In particolare, essa influenza in modo decisivo l'adesione cellulare e il differenziamento iniziale (D. Buser et al 2004;. Itthichaisri C. et al 2007). E' stato riscontrato che le superfici ruvide di titanio inducono l'osteointegrazione più rapidamente rispetto alle superfici lisce mentre è ancora poco chiaro come la superficie possa influenzare il comportamento delle cellule mesenchimali.

La via di segnalazione Wnt ha un ruolo centrale nella embriogenesi e nella omeostasi dei tessuti adulti (Nusse, 2008; Clevers H, 2006). La via di segnalazione Wnt è necessaria per la formazione ossea (Venkatesh K., 2006; Baron & Rawadi, 2007) e regola il rimodellamento osseo aumentando l'espressione di osteoprotegerina, un recettore decoy di RANKL. RANKL regola il riassorbimento osseo controllando l'osteoclastogenesi (Boyce & Xing, 2008; di vetro, 2005; Yasuda H. et al, 1998). Anomalie nella segnalazione Wnt / β -catenina sono coinvolte in molte malattie umane, tra cui il cancro, l'osteoporosi, l'invecchiamento e malattie degenerative (Luna RT et al, 2004). Diversi studi pubblicati negli ultimi decenni hanno messo in luce in diversi modelli animali e linee cellulari la complessità della via Wnt e il ruolo versatile della β -catenina come fattore di trascrizione. I principali effettori della via di segnalazione Wnt sono il fattore di trascrizione β -catenina / TCF, formato da β -catenina libera e un fattore TCF (TCF-1, TCF-3, TCF-4 e LEF-1) (Tianru Jin et al, 2008). Molti studi hanno dimostrato che il complesso β -catenin/TCF può essere attivato dalle glicoproteine Wnt, insulina, il fattore di crescita insulin-like-1 (IGF-1), altri fattori ormonali e dall'acido lisofosfatidico (LPA) (Fenghua Yi et al. 2007). E' stato stabilito uno schema generale del segnale Wnt / β -catenina: in assenza di stimoli, la concentrazione di β -catenina libera è controllata da un processo di degradazione proteasomiale con la partecipazione del gene oncosoppressore APC, Axin, glicogeno sintasi chinasi-3 (GSK-3) e caseina chinasi-1 α (CK-1 α) (Bradley W. Doble, 2003;

Zeng e Huang, 2008). La stimolazione Wnt esercita il suo effetto attraverso recettori specifici dotati di sette domini trans membrana, Frizzled (Fz), e corecettori LRP 5/6. A seguito del legame con il recettore, i segnali Wnt sono trasmessi dalla associazione tra i recettori Wnt e Dishevelled (DVL), un evento che innesca la disgregazione del complesso contenente APC, Axin, GSK-3 e β -catenina, prevenendo quindi la degradazione fosforilazione-dipendente di β -catenina. La proteina β -catenina così stabilizzata è trasportata al nucleo e forma complessi con TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factor)(Mosimann C. et al, 2009).

Così, la regolazione della degradazione β -catenina sembra essere un meccanismo di controllo importante della via di segnalazione Wnt canonica. Coerentemente con questa idea è stata indotta l'espressione di una forma di β -catenina mutante (S33Y) che non può essere fosforilata dal complesso di distruzione e quindi degradata e si è osservato che gli effetti della topografia di superficie sono stati annullati, suggerendo che la topografia della superficie possa avere un effetto permissivo sulla segnalazione Wnt canonica agendo sulla degradazione della β -catenina. In altre parole, la topografia di superficie SLA sembra influenzare il comportamento delle cellule amplificando le risposte cellulari ai fattori Wnt.

Non ci sono evidenze scientifiche di una diretta stimolazione della via canonica di segnalazione Wnt nelle cellule C2C12, ma piuttosto una stimolazione dell'attivazione della Wnt/ β -catenina, in presenza di segnali molecolari esogeni appropriati. Questo può essere in parte spiegato dai tempi sperimentali brevi dello studio: le cellule sono state transfettate al momento della semina e analizzate 24 ore dopo la semina per evitare la confluenza delle cellule. Questo breve periodo di tempo non ha permesso la creazione di un microambiente extracellulare in grado di stimolare in maniera indipendente questi percorsi intracellulari, ma la responsività delle cellule ai segnali che abbiamo fornito è stata comunque influenzata dalla topografia della superficie.

Inoltre, l'aumento del segnale della β -catenina non sembra essere dovuto a un controllo trascrizionale di β -catenina: abbiamo trovato che i livelli di mRNA di β -catenina, rimangono

immutati nelle cellule C2C12 indipendentemente dalle superfici utilizzate. Pertanto, un aumento dei livelli della proteina, dovuti ad una diminuzione della degradazione, piuttosto che ad un aumento della trascrizione β -catenina, è probabilmente responsabile della up regolazione dell'espressione dei geni target che abbiamo riscontrato nelle cellule coltivate su titanio ruvido.

Coerentemente con questa idea, è stata valutata l'espressione di Axin 2 / Axil / Conductin, un omologo di Axin 2. Axin 2 è una proteina chiave nella via di Wnt ed è necessaria per la fosforilazione di Lrp6 attraverso la sua capacità di reclutare GSK3. L'inibizione di GSK3 a livello della membrana plasmatica blocca invece il segnale Wnt / β -catenina (Xin Zeng et al. 2008). Sono note due isoforme importanti, Axin1 e Axin2, che condividono funzioni simili ma hanno una distribuzione leggermente diversa (Chia, Costantini F., 2005).

Accanto al complesso di distruzione β -catenina, Axin 2 è un bersaglio diretto della catenina β / TCF creando così un ciclo di feedback negativo. Poiché, come già descritto in precedenza, Axin2 è un noto gene target di Wnt / β -catenina, i nostri risultati confermano che i livelli di Axin 2 sono stati aumentati dalla sovraespressione di Wnt3a ma sono stati ostacolati in cellule in crescita su superfici ruvide, rispetto al titanio liscio.

La regolazione di Axin2 attraverso la β -catenina (Jho, Zhang et al. 2002) è parte di un complesso meccanismo di controllo di segnalazione Wnt. Recenti studi hanno dimostrato che il complesso Axin-GSK3 è reclutato ai siti Pro-Pro-Ser-Pro del recettore LRP5 / 6, inibendo così la formazione del complesso di distruzione ((Tamai K. et al, 2004 , Zeng, Huang et al 2008). Considerando che i livelli di Axin sono nettamente inferiori a quelli degli altri componenti del complesso di distruzione, si ritiene che la sua regolazione abbia un profondo effetto sulla segnalazione Wnt (Lee, Salica et al 2003).

I risultati indicano che le superfici ruvide controllano l'espressione di Axin2 a livello di mRNA e questo processo rappresenta un'importante meccanismo attraverso il quale la topografia di superficie aumenta la via di segnalazione di Wnt / β -catenina. Ulteriori meccanismi sono comunque

coinvolti nella regolazione della via di segnalazione Wnt e nella distribuzione delle cellule condizionata dalla topografia di superficie.

Infatti, i dati immunocitochimici suggeriscono che sebbene la stimolazione con Wnt3a aumenti i livelli di β -catenina nelle cellule su entrambe le superfici lisce e ruvide, su superfici SLA la β -catenina trasloca al nucleo in maggiore quantità, mentre una maggiore fluorescenza è presente nel citoplasma delle cellule cresciute su superfici lisce (C. Galli et al, 2010).

L'influenza di superfici ruvide sul comportamento delle cellule mesenchimali è stato anche studiato a livelli dell'mRNA del gene bersaglio β -catenina. E' stato dimostrato che le superfici ruvide migliorano l'espressione dei geni bersaglio di β -catenin Wnt3a-indotta, come della fosfatasi alcalina, osteoprotegerina, e Wisp-2. Inoltre, le cellule che crescono su superfici ruvide avevano aumentati livelli di mRNA della Connexin 43 (Cx43) e cicloossigenasi-2 (Cox-2) sia a livello basale che dopo stimolazione con Wnt3a. Cx43 è uno dei principali componenti delle gap junctions (Civitelli, 2008), dei canali cellulari aperti che permettono la trasmissione di segnali cellula-cellula. Inoltre, Cx43 costituisce anche emicanali transmembrana (Goodenough & Paul, 2003) attraverso i quali piccole molecole, come PGE2, possono essere rilasciati in risposta a una stimolazione meccanica (Cherian & Siller-Jackson, 2005). È interessante notare che Cox-2 è l'enzima responsabile della sintesi di PGE2 (Greenhough, 2009). Ciò è coerente con l'osservazione che i livelli di PGE2 sono aumentati nei surnatanti di cellule coltivate su superfici irregolari, e che sono importanti mediatori degli effetti della topografia sulle cellule mesenchimali (Boyan & Lohmann, 2001). Tuttavia sono necessari ulteriori studi per indagare il possibile ruolo di PGE2 nel regolare la via di segnalazione Wnt su superfici di titanio.

I risultati di questo lavoro di tesi hanno mostrato livelli significativamente più elevati di mRNA di Snail in cellule in crescita su superfici ruvide, almeno a livello basale. Snail è un fattore di trascrizione conosciuto per reprimere i geni marcatori epiteliali e causare epiteliali di transizione mesenchimale, un processo fondamentale nella biologia del cancro (E Batlle, 2000). Più

recentemente è stato anche dimostrato che Snail gioca un ruolo importante nella regolazione della crescita e sopravvivenza cellulare (Barrallo-Gimeno e Nieto 2005), oltre a aumentare la trascrizione dei geni bersaglio Wnt (Stemmer, 2008). Non si può escludere quindi che i livelli più elevati di Snail che abbiamo osservato abbiano contribuito ad aumentare la segnalazione Wnt / β catenina nelle cellule C2C12 coltivate su superfici ruvide.

Abbiamo inoltre studiato l'espressione di osteocalcina, il marcatore più usato per il fenotipo osteoblastica, e abbiamo osservato che la differenza di espressione su superfici con diverse topografie è abolita se l'attività trascrizionale della β -catenina / TCF è inibita. Curiosamente, questo sembra essere dovuto ad un aumento dei livelli di osteocalcina su superfici lisce piuttosto che, come ci aspettavamo, per la sua diminuzione su superfici SLA. Tuttavia, questo effetto può essere attribuito al complesso e solo parzialmente compreso ruolo dei fattori Wnt nelle diverse fasi del differenziamento cellulare.

Recentemente, alcuni studi hanno suggerito che lo stress ossidativo abbia un ruolo essenziale nelle degenerazioni scheletrica legate all'invecchiamento, mostrando come la carenza di estrogeni induca la perdita di tessuto osseo attraverso una maggiore produzione di ROS, mentre gli antiossidanti sopprimono la differenziamento e l'attività degli osteoclasti. Inoltre, i ROS impediscono la differenziamento osteoblastica mentre gli antiossidanti aumentano la differenziamento di osteoblasti. Lo stress ossidativo può causare danni alle cellule fino alla morte cellulare in molti tessuti (Quarrie & Riabowol, 2004). L'importanza della β -catenina nella fisiologia della cellula è evidenziata dall'osservazione che β -catenina è al crocevia di Wnt e le vie di segnale del recettore nucleare, agendo come un interruttore cruciale per percorsi alternativi molecolare, come quello che protegge le cellule dallo stress ossidativo.

I ROS sono altamente reattivi nei confronti di proteine, lipidi e DNA. Nonostante bassi livelli di ROS sono necessari per alcune vie di segnalazione cellulare, la loro produzione continua negli organelli cellulari causa danni cellulari che si accumulano nel tempo. Inoltre, lo stress ossidativo è

un segno distintivo di infiammazione. Le cellule quindi richiedono un meccanismo di omeostasi molto rigoroso nella produzione di ROS e un efficiente sistema di riparazione in grado di tollerare i livelli di ROS necessari per la normale funzione cellulare, che altrimenti provocherebbero la morte cellulare (Essers, 2005).

Le cellule possiedono una rete anti-ossidante per rispondere a effetti negativi del ROS, che include una varietà di proteine scavenger, come SOD, catalasi, Gadd45, glutatione perossidasi (Finkel Toren, 2003). Diversi studi hanno anche mostrato un'associazione tra le proteine Forkhead a un'aumentata resistenza allo stress in *Cenerabditis elegans*, *Drosophila* e in mammiferi. Sembra quindi che lo stress ossidativo attivi FOXO in un meccanismo di controllo feedback negativo della produzione dei ROS (Honda e Honda, 1999; Daitoku e Fukamizu, 2007; Henderson ST et al, 2001; Junger MA et al, 2003).

I membri della famiglia FoxOs sono tutti caratterizzati da un dominio legante il DNA di 100 aminoacidi, chiamato dominio Forkhead (Brunet, Bonni et al 1999; Huang e Tindall 2007). In assenza di fattori di crescita o insulina, ed in presenza di stressor, la proteina forkhead box O (FOXO) è localizzata nel nucleo dove promuove la trascrizione di geni bersaglio coinvolti nella segnalazione dell'apoptosi come TRAIL, FasL e Bim (Nakamura e Sakamoto, 2008; Dijkers, Medema et al. 2000) o compete con il fattore TCF per un gruppo limitato di β -catenina, aumentando la trascrizione del gene gadd45 in modo forkhead-dipendente (Tran, Brunet et al. 2002; Furukawa-Hibi Y. et al 2002). Allo stesso modo, è stato dimostrato che le proteine Forkhead dei mammiferi regolano la trascrizione di proteine antiossidanti che degradano il superossido e il perossido di idrogeno (Kops, Dansen et al 2002; Finkel, 2002). Infatti, la β -catenina funziona come una molecola chiave nella difesa contro lo stress ossidativo servendo come partner per il fattore di trascrizione della proteina Forkhead box O (FOXO). Così, le proteine FOXO, che mediano soprattutto l'invecchiamento e la risposta allo stress, e i fattori TCF, che mediano soprattutto lo sviluppo e la proliferazione cellulare, competono per un gruppo limitato di β -catenina.

I risultati presentati in questo studio mostrano che le cellule coltivate su superfici ruvide di titanio sono più resistenti al danno cellulare indotto dai ROS. In accordo con questa conclusione, i livelli di attività di un vettore regolato da un elemento FoxO erano superiori su superfici irregolari, sia a livello basale che dopo l'aggiunta di H₂O₂. Inoltre un maggior numero di cellule vitali erano presenti su superfici SLA che su superfici lisce dopo il trattamento con H₂O₂ (0,1 mM). Queste osservazioni sono anche supportate dai risultati che mostrano che le cellule coltivate su superfici ruvide esprimono aumentati livelli dei prodotti di trascrizione dei geni bersaglio FoxO, come catalasi, MnSOD, O₂, e Gadd45, che è responsabile per la riparazione del DNA.

L'attività trascrizionale di FoxO richiede β -catenina, analogamente a TCF. Quindi, per attivare le difese cellulari contro i ROS, FoxOs devono competere con TCF/Lef1 per legare la β -catenina. E' stato in precedenza dimostrato che lo stress ossidativo da ROS antagonizza la via canonica di segnalazione Wnt, deviando il pool citosolico libero de β -catenina lontano da TCF (Almeida, Han et al 2007;. Hoogeboom, Essers et al 2008), meccanismo fondamentale per mantenere l'omeostasi ossea (Ambrogini, Almeida et al 2010)..

I nostri risultati hanno confermato che la trascrizione TCF-mediata nelle cellule C2C12 coltivate su superfici lisce o ruvide di titanio è inibita da ROS, e che le differenze di attivazione nella via di segnalazione Wnt tra la diversa superficie scompare dopo l'aggiunta di H₂O₂, a seguito del fatto che β -catenina è spinta in percorsi differenti.

Quando le cellule coltivate su superfici lisce o ruvide sono state sottoposte a stress ossidativo aggiungendo perossido di idrogeno, le cellule sulle superfici ruvide hanno mostrato una maggiore resistenza alla morte cellulare. Abbiamo inoltre dimostrato che la superficie non influisce sulla generazione di ROS, osservando lo stesso livello di stress ossidativo in entrambi i gruppi di superfici in titanio. Quindi, è probabile che sia un meccanismo cellula-dipendente responsabile della migliore resistenza delle cellule sulle superfici ruvide.

6. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata esaminata la risposta delle cellule mesenchimali in crescita a contatto con dischi di titanio con una topografia di superficie variabile, tra cui una superficie liscia ed una superficie ruvida (SLA). Si è cercato quindi di stabilire il ruolo della topografia nel controllare e modulare il comportamento cellulare e di valutare come la topografia stessa possa influenzare la risposta cellulare allo stress ossidativo.

Il presente lavoro dimostra che superfici ruvide di titanio migliorano l'attivazione dei pathway β -catenina-dipendenti, sia lungo la cascata mediata da Wnt, importante per la proliferazione e la differenziazione cellulare, sia lungo la cascata di FoxO, che mira a difendere e riparare la cellula con un conseguente aumento della resistenza cellulare contro i ROS.

Ulteriori indagini saranno quindi necessarie per comprendere il legame tra gli eventi molecolari che promuovono il differenziamento degli osteoblasti e la topografia di superficie.

Questa ricerca dimostra che la via di segnalazione Wnt controlla il comportamento cellulare in presenza di diverse topografie di superficie. Questa via di segnalazione sembra essere utilizzata dalle cellule per riconoscere la topografia dell'ambiente circostante e rispondere di conseguenza.

Ciò fornisce una visione più completa del comportamento delle cellule a contatto con superfici ruvide e fornisce alcuni importanti risultati per comprendere meglio le basi cellulari e molecolari delle prestazioni cliniche degli impianti dentali. Questi risultati preliminari potrebbero contribuire a orientare il clinico nella scelta di un'adeguata superficie per l'impianto in diversi contesti clinici, e potrebbe essere una base importante per studi futuri volti a sviluppare superfici per impianti ancora più efficienti.

BIBLIOGRAFIA

Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A., Kemler R. « β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.» *Embo Journal* 16 (1997): 3797-3804.

Accili D., Karen C Arden. «FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation.» *Cell* 117 (2004): 421-426.

Albrektsson T., P.I. Brånemark, H.A. Hanss. «Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.» *Acta Orthop. Scand*, n. 52 (1981): 155-170.

Almeida M., Han L., Martin-Millan M., O'Brien C.A., Manolagas S.C. «Oxidative Stress Antagonizes Wnt Signaling in Osteoblast Precursors by Diverting β -Catenin from T Cell Factor- to Forkhead Box O-mediated Transcription.» *The Journal of Biological Chemistry* 282, n. 37 (2007): 27298–27305.

Ambrogini E., Almeida M., Martin-Millan M., Paik JH, Depinho RA, Han L., Goellner J., Weinstein R.S., Jilka R.L, O'Brien C.A., Manolagas S.C. «FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice.» *Cell Metab* 11, n. 2 (2010): 136-146.

Anselme K. «Osteoblast adhesion on biomaterials.» *Biomaterials*, n. 21 (2000): 667-681.

Aubin J.E., J.T. Triffitt. «Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation.» In *Principles of Bone biology*, 59-82. New York: Academic Press, 2002.

Babij P., et al. «High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene.» *Journal of Bone Mineral Research*, n. 18 (2003): 960-974.

Baek W.Y., M.A. Lee. «Positive Regulation of Adult Bone Formation by Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix.» *J Bone Miner Res* 24 (2009): 1055-1065.

Baron R., G Rawadi. «Targeting the Wnt/b catenin pathway to Regulate Bone Formation in the Adulte Skeleton.» *Endocrinology* 146, n. 6 (2007): 2635-2643.

Barrallo-Gimeno A., Nieto M. A. «The Snail genes as inducers of cell movement and survival: Implications in development and cancer.» *Development* 132 (2005): 3151–3161.

Battle E., Sancho E., Franci C., Dominguez D., Monfar M., Baulida J., Garcia De Herreros A. «The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.» *Nat Cell Biol* 2 (2000): 84-89.

Behrens J., et al. «Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF1.» *Nature*, n. 382 (1996): 638-642.

Bennett C.N., H Ouyang. «Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation.» *J Bone Miner Res* 22, n. 12 (2007): 1924-1932.

Bikramjit B., *Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing and Applications*. Wiley, 2009.

Bowerman B. «Oxidative stress and Cancer: A beta-catenin convergence.» *Science* 308, n. 5725 (2005): 1119-1120.

Bowers K.T., J.C. Keller, B.A. Randolph, D.G. Wick, C.M. Michaels. «Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro.» *Int J Oral Maxillofac Implants*, n. 7 (1992): 302–310.

Boyan B.D., C. H. Lohmann. «Both cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mediate osteoblast response to titanium surface roughness.» *J Biomed Mater Res* 55, n. 3 (2001): 350-359.

Boyan B.D, David D. Dean. “Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response.” *Biomaterials*, n. 17 (1996): 137-146.

Boyan B.D., Christoph H Lohamann, David D Dean, Victor L Sylvia, David L Cochran, Z. Schwartz. «Mechanism Involved in Osteoblast response to Implant Surface Morphology.» *Annu. Rev. Mater. Res.*, n. 31 (2001): 357-371.

Boyce B.F., L. Xing. «Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.» *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 (2008): 139–146.

Boyden L.M. «High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5.» *N Engl J Med*, n. 346 (2002): 1513–1521.

Boyle B, William J, Scott W Simonet, David L Lacey. «Osteoclast differentiation and activation.» *Nature*, n. 423 (2003): 337-342.

Bradley W. Doble, James R. Woodgett. «GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase.» *Journal of Cell Science* 116 (2003): 1175-1186.

Brunet A. «DNA repair pathway stimulated by the Forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein.» *Science* 296, n. 5567 (2002): 530-534.

Brunet A., A. Bonni. “Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.” *Cell* 96, n. 6 (1999): 857-868.

Burg Karen J L, Scott Porter, James F Kellam. «Biomaterial developments for bone tissue engineering.» *Biomaterials*, n. 21 (2000): 2347-2359.

Buser D., R.K. Schenk, S. Steinemann, J.P. Fiorellini, C.H. Fox, H. Stich. «Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs.» *J Biomed Mater Res* 25, n. 7 (1991): 889–902.

Buser D. «Titanium for dental application (II): implants with roughened surfaces.» *Titanium in Medicine*, 2001: 232-239.

Buser D., N. Broggin. «Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface.» *J Dent Res* 83, n. 7 (2004): 529-533.

Itthichaisri C., M. Weidmann-Al-Ahmad. «Comparative in vitro study of the proliferation and growth of human osteoblastic-like cells on various biomaterials.» *J Biomed Mater Res A* 82, n. 4 (2007): 777-787.

Carinci, F., F. Pezzetti, e F. Francioso, D. Arcelli, J. Marchesini, L. Scapoli, A. Piattelli S. Volinia. «Analysis of Osteoblast-like MG63 Cells' Response to a Rough Implant Surface by Means of DNA Microarray.» *Journal of Oral Implantology* 29, n. 5 (2003): 215-220.

Galli C, Passeri G., Ravanetti F., Elezi E., Pedrazzoni M., Macaluso G.M. “Rough surface topography enhances the activation of Wnt/b-catenin signaling in mesenchymal cells.” *J Biomed Mater Res A*. (in press)

Chakrabarti R., S. Kundu. «Vitamin A as an Enzyme That Catalyzes the Reduction of MTT to Formazan by Vitamin C.» *Journal of Cellular Biochemistry* 80 (2000): 133-138.

- Cherian P.P., J. Siller-Jackson. «Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin.» *Mol Biol Cell* 16, n. 7 (2005): 3100-3106.
- Chia I.V., F. Constantini. «Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo.» *Mol Cell Biol* 25 (2005): 4371-4376.
- Civitelli R. «Cell-Cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage.» *Arch Biochem Biophys* 16, n. 7 (2008): 3100-3106.
- Clevers H. «Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.» *Cell* 127 (2006): 469-480.
- Daniels D.L., Weis W.I. « β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation.» *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (2005): 364 - 371.
- de Frutos, Cristina A, Romain Dacquin, Sonia Vega, Pierre Jurdic, Machuca-Gayet Irma, M Angela Nieto. «Snail1 controls bone mass by regulating Runx2 and VDR expression during osteoblast differentiation.» *EMBO J* n. 28 (2009): 686-996.
- Dijkers P. F., R. H. Medema. «Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the Forkhead transcription factor FKHR-L1.» *Curr Biol* 10, n. 19 (2000): 1201-1204.
- Doble B.W., S. Patel, G.A. Wood, L.K. Kockeritz, JR Woodgett. «Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines.» *Dev Cell* 6, n. 12 (2007): 957-971.
- Doty S.B. «Morphological evidence of gap junctions between bone cells.» *Calcif. Tissue Int.*, n. 33 (1981): 509.
- Ducy P., R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall, G. Karsenty. «Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.» *Cell* 89 (1997): 747-54.
- Essers M.A., Lydia M. M de Vries-Smits, N Barker, PE Polderman, Boudewijn M. T. Burgering, Hendrik C. Korswagen. «Functional interaction between β -catenin and FoxO in oxidative stress signaling.» *Science*, n. 308 (2005): 1181-1184.

- Feng X. «Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts.» *Gene*, 2005: 1-13.
- Fenghua Yi, Jane Sun, Gareth E. Lim, I. George Fantus, Patricia L. Brubaker, Tianru Jin. «Cross Talk between the Insulin and Wnt Signaling Pathways: Evidence from Intestinal Endocrine L Cells.» *Endocrinology* 149, n. 5 (2007): 2341-2351.
- Franzoso G., L. Carlson, L. Xing, L. Poljak, E.W. Shores. «Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development.» *Genes Dev.* 11 (1997): 3482–3496.
- Fukamizu H. Daitoku, Akiyoshi. «FOXO Transcription Factors in the Regulatory Networks of Longevity.» *Journal of Biochemistry* 141, n. 6 (2007): 769-774.
- Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K., T. Ohta, K. Ikeda, N. Motoyama. «FOXO forkhead transcription factors induce G(2)–M checkpoint in response to oxidative stress.» *J. Biol. Chem.* 277 (2002): 26729–26732.
- Galli C., G. Passeri, G.M. Macaluso. «Osteocytes and WNT: the Mechanical Control of Bone Formation.» *J Dent Res* 89 (2010): 331-343.
- Germanier Y., S. Tosatti, N. Brogini, e M.,Buser, D. Textor. «Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces.» *Clinical Oral Implants Research* 17, n. 3 (2006): 251 - 257.
- Glass D.A., et al. «Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation.» *Dev Cell* 8, n. 5 (2005): 751-764.
- Gong Y., R.B. Slee. «LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development.» *Cell*, n. 107 (2001): 513-523.
- Goodenough D.A., D.L. Paul. «Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels.» *Nat Rev Mol Cell Biol* 281, n. 32 (2003): 22429-22433.
- Greenhough A., H. J. Smartt. «The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment.» *Carcinogenesis* 30, n. 3 (2009): 377-3786.

- Gronowicz G., e M.C. McCarthy. «Response of human osteoblasts to implant materials: Integrin-mediated adhesion.» *Journal of Orthopaedic Research* 14, n. 6 (1996): 878 - 887.
- Harter L.V., K.A. Hruska, R.L. Duncan. «Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation.» *Endocrinology*, n. 136 (1995): 528–535.
- Henderson S.T., T.E. Johnson. «Daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*.» *Curr Biol* 11 (2001): 1975–1980.
- Hill T.P. «Canonical Wnt/beta catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes.» *Dev Cell* 8, n. 5 (2005): 727-736.
- Finkel F., Nikki J. Holbrook. «Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.» *Nature*, n. 408 (2000): 239-247.
- Holtrop M.E. «The ultrastructure of bone.» *Ann. Clin. Lab. Sci* 5, 1975: 264.
- Honda Y., S. Honda. «The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*.» *FASEB J* 13 (1999): 1385–1393.
- Hoogeboom D., M.A. Essers, P.E. Polderman, E. Voets, L.M. Smits, B.M. Burgering. «Interaction of FoxO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity.» *J Biol Chem* 283, n. 14 (2008): 9224-9230.
- Hu H., M.J. Hilton. «Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development.» *Development* 132 (2005): 49-60.
- Huang H., D. J. Tindal. «Dynamic FoxO transcription factors.» *J Cell Sci* 120 (2007): 2479-2487.
- Iqbal J., L. Sun, M. Zaidi. «Coupling bone degradation to formation.» *Nature America* 5, n. 7 (2009): 757–765.
- Jho E. H., T. Zhang. «Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway.» *Mol Cell Biol* 22, n. 4 (2002): 1172-1183.

Junger M.A., et al. «The Drosophila Forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling.» *J Biol* 2 ((2003)): 20.

Kang S., CN. Bennett, I. Gerin, LA. Rapp, KD. Hankenson, OA. MacDougald. «Wnt Signaling Stimulates Osteoblastogenesis of Mesenchymal Precursors by Suppressing CCAAT/Enhancer-binding Protein α and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ .» *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007): 14515-14524.

Katagiri T., A. Yamaguchi. «Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.» *J Cell Biol* 127, n. 6 P1 (1994): 1755-1766.

Kato M., Patel. M.S., L. Levasseur, L. Lobov. «Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor.» *Journal of Cell Biol*, n. 157 (2002): 303–314.

Keselowsky BG., L. Wang, Z. Schwartz, AJ. Garcia, BD. Boyan. «Integrin alpha(5) controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner.» *J Cell Biol* 80, n. 3 (2007): 700-710.

Kim, J.H. et al., «The Effect of Nanotubular Titanium Surfaces on Osteoblast Differentiation.» *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10, n. 5 (2010): 3581-3585.

Kimelman D., W. Xu. « β -catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective.» *Oncogene* 25, n. 57 (2006): 7482-91.

Kolligs F.T., G. Hu, C.V. Dang, E.R. Fearon. «Neoplastic Transformation of RK3E by Mutant beta-Catenin Requires Deregulation of Tcf/Lef Transcription but Not Activation of c-myc Expression.» *Molecular and Cellular Biology* 19, n. 8 (1999): 5696-5706.

Komori T., «Mechanism of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts.» *Mechanism of transc. Clin Calcium*, n. 16 (2006): 801-807.

Komori T., et al. «Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.» *Cell*, n. 89 (1997): 755-764.

Kops G.L., et al. «Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress.» *Nature*, n. 419 (2002): 316-321.

korswagen H.C. «Regulation of the Wnt/ β -catenin pathway by redox signaling.» *Developmental Cell* 10, n. 6 (2006): 687-688.

Le Guehenec L., «Osteoblastic cell behaviour on different implant surfaces.» *Acta Biomaterialia*, n. 4 (2008): 535-543.

Le Guéhenec L., A. Soueidana, P. Layrolle, Y. Amouriq. «Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration.» *Dent Mater* 23, n. 7 (2007): 844–54.

Lee E., A. Salic, R. Kruger, R. Heinrich, M.V. Kirschner. «The Roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway.» *PLoS BIOL* 1, n. 1 (2003): E10.

Linez-Bataillon P., F. Monchau, M. Bigerelle, H.F. Hildebrand. «In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates.» *Biomolecular Engineering* 19 (2002): 133-141.

Ling L., V. Nurcombe, S.M. Cool. «Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells.» *Gene* 433 (2009): 1-7.

Logan C.Y., R. Nusse. «The Wnt signaling pathway in development and disease.» *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 (2004): 781-810.

Lorenzo J., M. Horowitz, Y. Choi. «Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system.» *Endocrine Reviews* 29, n. 4 (2008): 403-440.

Lossdörfer, S., e L. Wang , C. H. Lohmann , J. D. Turner , M. Wieland, D. L. Cochran , B. D. Boyan Z. Schwartz. «Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity.» *Journal of Biomedical Materials Research* 70, n. 3 (2004): 361-369.

Luthen, F., Petra Beckerc, Joachim Rychlya, Ulrich Beckb Regina Langeb, e J.G. Barbara Nebea. «The influence of surface roughness of titanium on β 1- and β 3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells.» *Biomaterials* 26, n. 15 (2005): 2423-2440.

- MacDonald B.T., Tamai K., He X. «Wnt/b-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases.» *Developmental Cell*, 2009.
- Manolagas S.C., M. Almeida. «Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism.» *Mol Endocrinol* 21, n. 11 (2007): 2605-2614.
- Manolagas S. C., R. L. Jilka G. Girasole, G. Passeri, T. Bellido. «Estrogen, cytokines, and the control of osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo.» *Osteoporosis International* 1 (1993): 114-116.
- Martínez-Reina, García-Aznarblaré. «A bone remodelling model including the directional activity of BMUs.» *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 8, n. 2 (2009).
- Meyer U., A. Büchter, H. P. Wiesmann, U. Joos. «Basic Reactions Of Osteoblasts On Structured Material Surfaces.» *European Cells and Materials* 9 (2005): 39-49.
- Moon R.T., J. D. Brown. «Structurally related receptors and antagonists compete for secreted Wnt ligands.» *Cell* 88, n. 6 (2002): 725-728.
- Moon RT, A.D. Kohn, G.V. De Ferrari, A. Kaykas. «WNT and beta catenin signaling: diseases and therapies.» *Nat Rev Genet* 5 (2004): 691-701.
- Morvan F., et al. «Deletion of the single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass.» *J Bone Miner Res* 21 (2006): 934-945.
- Mosimann C., G. Hausmann, K. Basler. «Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation.» *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, n. 10 (2009): 276-286.
- Müller U., T. Gross, C. Fritz, P. Voigt, G. Fischer, S. Berger. «Evaluation at the interfaces between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles.» *Clinical Oral Implants Research* 14, n. 3 (2003): 349 - 356.
- Mustafa K., A. Wennerberg, J. Wroblewski, K. Hultenby, B. Silva Lopez, K. Arvidson. «Determining optimal surface roughness of TiO₂ blasted titanium implant material for attachment,

proliferation and differentiation of cells derived from human mandibolar bone.» *Clin. Oral Impl.Res.*, n. 12 (2001): 515-525.

Nakamura H. «Morphology, function and differentiation of bone cells.» *Jurnal of Hard Tissue Biology* 16, n. 1 (2007): 15-22.

Nakamura T., K. Sakamoto. «Forkhead transcription factor FOXO subfamily is essential for reactive oxygen species-induced apoptosis.» *Mol Cell Endocrinol* 281, n. 1-2 (2008): 47-55.

Nakashima K., B. de Crombrughe. «Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation.» *Trends in Genetics* 19, n. 8 (20003): 458-466.

Nakashima K., X Zhou. «The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.» *Cell* 108 (2002): 17-29.

Nemoto S.; Finkel T. «Oxidant signals and oxidative stress.» *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2003): 247–254.

Norvell S.M., J. P. Bidwell M. Alvarez, F. M. Pavalko. «Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts.» *Calcified Tissue International* 75, n. 5 (2004): 396-404.

Nusse R. «Wnt signaling and stem cells control.» *Cell Res* 295, n. 5564 (2008): 523-527.

Owen M. «Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.» *Bone and Mineral research* (Elsevier Science Publisher), n. 3 (1985).

Palmieri A., Pezzetti F. «Titanium Acts on Osteoblast Translational Process.» *Journal of Oral Implantology* 34, n. 4 (2008): 190-194.

Pittenger M.F., et al. «Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.» *Science* 284 (1999): 143.

Quarrie Jason K., Karl T. Riabowol. «Murine Models of Life Span Extension.» *Sci. Aging Knowl. Environ* 31 (2004): p.re 5.

Rawadi R.,G. Baron «Targeting the Wnt/beta-Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton.» *Endocrinology* 148, n. 6 (2007): 2635–2643.

- Robledo R.F., L. Rajan, X. Li, T. Lufkin. «The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development.» *Genes. Dev.*, n. 16 (2002): 1089-1101.
- Robling B., A. Castillo, C Turner. «Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling.» *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8 (2006): 455-498.
- Rodan G.A., S.B. Rodan. «Expression of the osteoblastic phenotype.» *Bone and Mineral Research*, 1984.
- Ross F.P. «Osteoclast biology and bone resorption.» *American society for bone and mineral research*, 2006: 30-35.
- Schneider G. B., H. Perinpanayagam. «Implant surface roughness affects osteoblast gene expression.» *J Dent Res* 82, n. 5 (2003): 372-376.
- Schwartz Z., Nasazky E., Boyan BD. «Surfaces microtopography regulates osseointegration: the role of implant surfaces microtopography on osseointegration.» *Alpha Omega*, n. 98 (2005): 9-19.
- Schwartz Z., C.H. Lohmann, J. Oefinger, L.F. Bonewald, D.D. Dean, B.D. Boyan. «Implant surfaces characteristics modulate differentiation behavior of cells in th osteoblastic lineage.» *J Dental Research* 82, n. 5 (1999): 472-376.
- Stemmer V., B. de Craene. «Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin.» *Oncogene* 27, n. 37 (2008): 5075-5080.
- Suda T., N. Udagawa, I. Nakamura, C. Miyaura, N. Takahashi. «Modulation of Osteoclast differentiation.» *Endocr. Rev.*, n. 16 (1992): 66-68.
- Sudo H., H.A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, S. Kasai. «In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria.» *J Cel Biol*, n. 96 (1986): 191-198.
- Takahashi N. et al., «Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation.» *Endocrinology*, n. 123 (1998): 2600–2.
- Tamai K., Zeng X., Liu C., Zhang X., Harada Y., Chang Z., He X. «A mechanism for wnt coreceptor activation.» *Mol Cell* 13 (2004): 149-156.

Tamai, K. «LDL-receptor-related proteins in Wnt signaling transduction.» *Nature*, n. 407 (2000): 530-535.

Tianru Jin, I. George Fantus, Jane Sun Tianru Jin , I. George Fantus, Jane Sun. «Wnt and beyond Wnt: Multiple mechanisms control the transcriptional property of β -catenin.» *Cellular Signalling* 20 (2008): 1697–1704.

Tran H., Brunet A., J.M. Grenier, S.R. Datta, A.J. Fornace Jr., P.S. DiStefano, L.W. Chiang, M.E. Greenberg. «DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein.» *Science* 296 (2002): 530–534.

Udagawa N., et al. «Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells.» *Cell Biology* 87 (1990): 7260-7264.

Vaananen H.K., H. Zhao, M. Mulari, J.M. Halleen. «The cell biology of osteoclast function.» *Journal of Cell Science* 113, n. 3 (2000): 377-381.

Venkatesh K., H.U. Bryant, O.A. MacDougald. «Regulation of bone mass by Wnt signaling.» *J Clin Invest.* 116, n. 5 (2006): 1202–1209.

Wall I., N. Donos, K. Carlqvist, F. Jones, P. Brett. «Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro.» *Bone*, n. 45 (2009): 17-26.

Wetterwald A., W Hoffstetter, MG Cecchini, B. Lanske, Wagner C. «Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes.» *Bone* 18 (1996): 125–32.

Witkowska-Zimny, Wrobel, Przybylsk. «The most important transcriptional factor of the osteoblastogenesis.» *Advances In Cell Biology* 2, n. 1 (2010): 17-28.

Xuan Z., MQ. Zang. «From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes.» *Mech Ageing Dev*, n. 126 (2005): 209-215.

Yasuda H., et al. «Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.» *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, n. 7 (1998): 3597-3602.

You J., et al. «Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts.» *J. Biol. Chem.*, n. 276, (2001): 449-453.

Zeng X., et al. «Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptors Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions.» *Development* 135, n. 2 (2008): 367-375.

Zhao G., A.L. Rainesa, M. Wielandb, Z. Schwartza, B.D. Boyan. «Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography.» *Biomaterials* 28, n. 18 (2007): 367-375.

Zhua X., J. Chena, L. Scheidlera, T. Altebaeumer, J. Geis-Gerstorfena, D. Kernb. «Cellular reactions of osteoblast to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces.» *Cells Tissues Organs*, n. 178 (2004): 13-22.

Zhuang H., W. Wang, AD. Tahernia, CL. Levitz, WT. Luchetti, CT. Brighton. «Mechanical strain-induced proliferation of osteoblastic cells parallels increased TGF-beta 1 mRNA.» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, n. 229 (1996): 449-453.

Zinger O., K. Anselme. «Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography.» *Biomaterials* 25, n. 14 (2004): 2695-2711.