

## I CONNETTIVI MCT DEGLI ECHINODERMI COME SCAFFOLD NATURALI PER COLTURE CELLULARI

C. DI BENEDETTO<sup>1</sup>, M.A. BARBOSA<sup>2,3</sup>, F. BONASORO<sup>1</sup>, A. BARBAGLIO<sup>1</sup>,  
M.D. CANDIA CARNEVALI<sup>1</sup>

Cristiano.dibenedetto@unimi.it

<sup>1</sup>Dip. di Biologia, Univ. degli Studi di Milano, Italia; <sup>2</sup>INEB, Instituto de Engenharia Biomédica, Porto, Portugal; <sup>3</sup>University of Porto, Faculty of Engineering

Gli echinodermi possiedono tessuti connettivi dotati di peculiari caratteristiche meccaniche e fisiologiche (MCTs-Mutable Collagenous Tissues). Recentemente il nostro gruppo ha ipotizzato che questi tessuti possano ispirare e costituire la fonte per la produzione di nuovi materiali, naturali o semi-artificiali, di interesse biomedico. Tra le più realistiche applicazioni proposte, vi è quella di utilizzare un MCT come *scaffold* per colture cellulari di echinodermi per le quali non sono ancora disponibili substrati pienamente idonei. Come primo approccio, in linea con quanto proposto in recenti e innovativi modelli sperimentali (OTT *et al.*, *Nature Medicine*, 2008), si è pensato di utilizzare un tessuto MCT opportunamente decellularizzato. Il modello da noi prescelto è la membrana peristomiale (PM) del comune echinoideo *Paracentrotus lividus*. La PM è stata decellularizzata tramite una sequenza di trattamenti che prevede l'utilizzo di una soluzione ipotonica (10mM TRIS, 0.1% EDTA) e di una soluzione di SDS 0.1%. La completa rimozione delle cellule dal tessuto è stata verificata tramite a) analisi in microscopia confocale (Leica TCSNT); b) analisi quantitativa del DNA presente mediante impiego di PicoGreen® (Invitrogen) in fluorimetria. Le PM decellularizzate sono state poi utilizzate come substrato di adesione per colture cellulari primarie ottenute dal fluido celomatico di *P. lividus*. I fenotipi presenti, già caratterizzati *in vivo* ed *in vitro*, sono celomociti, fagociti, cellule pigmentate e cellule a sferule, piastrati utilizzando un Leibovitz® modificato come mezzo di coltura. Dopo una settimana dalla semina cellulare, le PM trattate ed i relativi controlli sono stati preparati per la microscopia confocale e il SEM (LEO-1430). Le nostre osservazioni mostrano come sulle PM trattate siano presenti, ben adesi e distribuiti, i diversi fenotipi attesi. Questi primi risultati incoraggiano successivi esperimenti volti a ottimizzare le condizioni di adesione e crescita, e possibilmente di differenziamento cellulare, su questa nuova tipologia di substrati "nature-derived".