



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Report tecnico sull'esecuzione di RT-PCR per rilevazione contaminanti pro-infiammatori

Committente: Titanmed srl

D O C U M E N T O R I S E R V A T O



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Scopo

Lo scopo del lavoro era misurare l'espressione, da parte di macrofagi in coltura, di alcuni geni-chiave coinvolti nel processo di infiammazione, utilizzando un protocollo *in vitro* sviluppato recentemente per analizzare la presenza di endotossine adese alla superficie. I test sono stati realizzati su tre campioni così suddivisi: un impianto "Nobel Biocare MKIII Groovy RP"; un impianto da voi fornito con DDT n. 626 del 13/3/2015: "IMPIANTO con lotto 003013 con trattamento superficiale SL Tecom Implantology" e un controllo su sola plastica.

Materiali e Metodi

I campioni valutati in questo lavoro erano i seguenti:

- Nobel Biocare MKIII Groovy RP ref. 32131
- IMPIANTO con lotto 003013 con trattamento superficiale SL Tecom Implantology
- Plastica

I campioni erano perfettamente confezionati e presumibilmente sterili, i blister erano sigillati. Per preservarne la sterilità sono state adottate manovre di manipolazione sotto cappa a flusso verticale.

Per valutare la quantità di endotossine adese è stata eseguita una misura di espressione genica mediante RT-PCR. Le prove sono state eseguite tramite la valutazione dell'espressione da parte di macrofagi J774A-1 di alcuni geni-chiave della risposta infiammatoria ad endotossine:

- Interleukin 1 beta (IL-1),
- Interleukin 6 (IL-6),
- Tumor Necrosis Factor alfa (TNF α),
- Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1),
- Cyclooxygenase 2 (COX-2)

Sulla scorta di una recente pubblicazione scientifica (Morra et. al 2012), in cui si correla l'espressione dei geni citati da parte della linea cellulare menzionata con la presenza di contaminazioni da endotossina, è stato adottato il seguente metodo analitico. L'espressione di tali geni a breve tempo (4h) è sostanzialmente controllata dal livello di endotossine adese ed è indipendente dalla topografia superficiale.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Sulla base di questa osservazione, la quantità di endotossine adese alle superfici implantari può essere misurata controllando la risposta trascrizionale di macrofagi J774A-1. Le misure sono state eseguite come segue: una sospensione di $2 \pm 0.15 \times 10^5$ cellule J774A-1, coltivate in DMEM (Gibco®) contenente L-glutamina 200uM (Gibco®, Life Technologies™) e 10% Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco®, Life Technologies™), penicillina e streptomicina è stata introdotta in piastrellini da coltura cellulare da 10cm² sterili in polistirene (P10 plates, Corning) contenenti i campioni. L'analisi di espressione genica è stata condotta utilizzando real time reverse transcription PCR (qRT-PCR). L'RNA totale è stato estratto dopo 4 h, utilizzando il Purelink® RNA Isolation Kit (Ambion®, Life Technologies™). La qualità dell'RNA è stata valutata controllando che il rapporto A260/A280 fosse di 2.0 ± 0.2 per valutare eventuali contaminazioni da DNA e controllando il rapporto A260/A230 (per valutare eventuali contaminazioni proteiche). L'RNA estratto è stato in seguito retro-trascritto per ottenere cDNA utilizzando il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ (Applied Biosystems™).

La quantificazione relativa dei geni è stata ottenuta utilizzando sonde TaqMan® specifiche per ogni gene valutato e 18S come gene di riferimento. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite in duplicato utilizzando un apparato 7900H Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) secondo le istruzioni del produttore. I grafici di espressione genica sono stati ottenuti normalizzando i dati utilizzando il software dedicato, secondo il metodo standard ΔC_t .

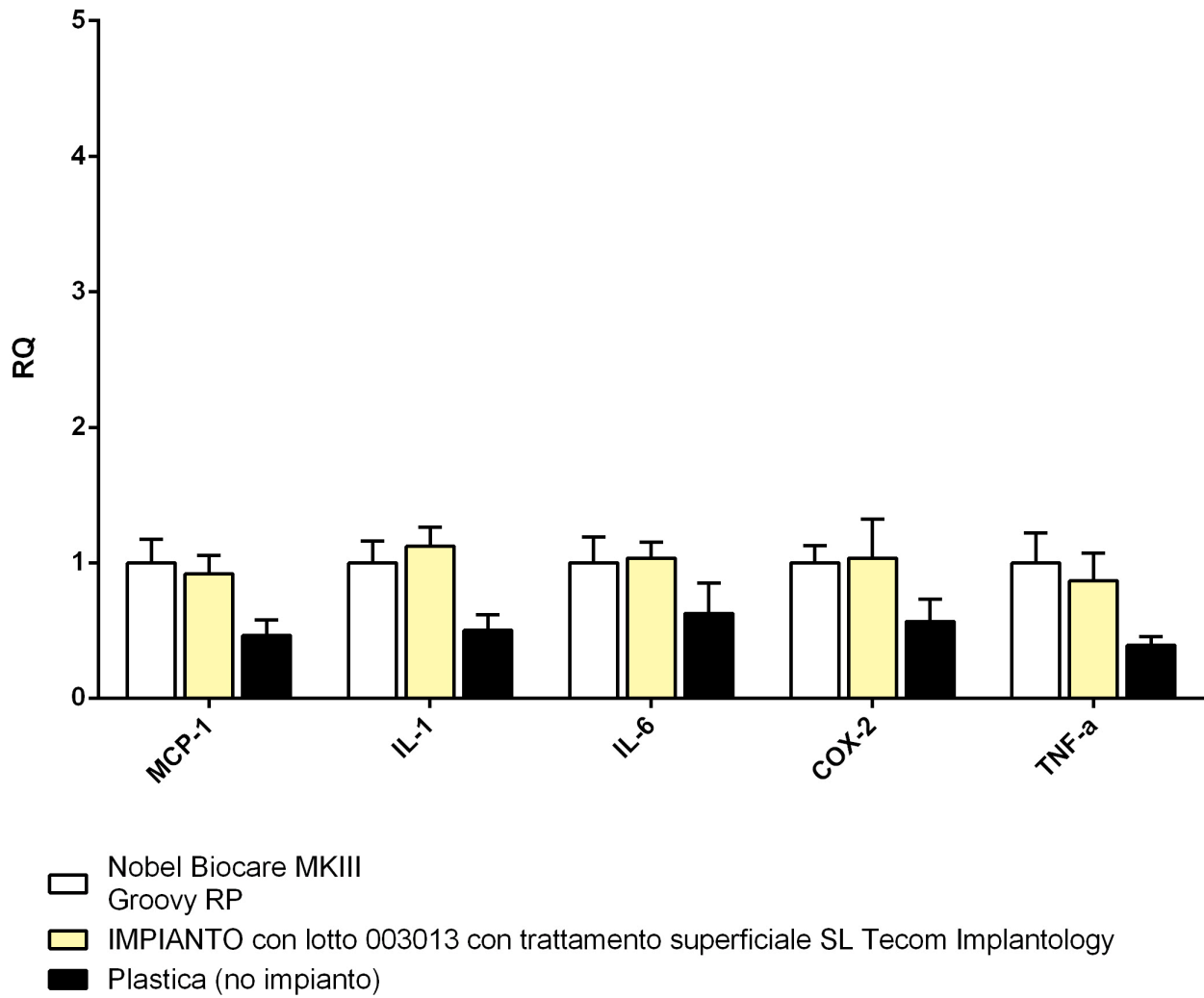
Risultati

I risultati delle misure di espressione genica sono riportati nel grafico. Per ogni gene, la prima barra mostra i risultati ottenuti su un impianto “Nobel Biocare MKIII Groovy RP ref. 32131”, la seconda barra mostra i dati ottenuti sul vostro impianto test “IMPIANTO con lotto 003013 con trattamento superficiale SL Tecom Implantology”, la terza barra mostra i risultati ottenuti su sola plastica.

In particolare i dati mostrano la quantificazione dell'espressione dei geni valutati -normalizzata rispetto al gene di controllo "18S"- e rapportati al campione “Nobel Biocare MKIII Groovy RP ref. 32131” che è posto con valore 1. Nel grafico sono inoltre mostrate le barre di errore standard ottenute in questo esperimento.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Conclusioni

In conclusione, il presente report indica che l'impianto test da voi fornito "IMPIANTO con lotto 003013 con trattamento superficiale SL Tecom Implantology" non determina una significativa sovra-espressione di geni pro-infiammatori da parte di macrofagi J774A-1 rispetto ad un impianto "Nobel Biocare MKIII Groovy RP ref. 32131", suggerendo una molto bassa quantità di endotossine adese. Possiamo quindi sostenere che non sussistono differenze pro-infiammatorie tra l'impianto test da voi fornito e un impianto "Nobel Biocare MKIII Groovy RP ref. 32131".

Torino, il 23/03/2015.

In fede,

Federico Mussano

A handwritten signature in blue ink that reads "Federico Mussano".