

La relazione è ben scritta.

Alcune critiche:

- le figure non hanno quasi mai le indicazioni degli assi. Bisogna indicarli sempre. In alcuni casi mancano anche le indicazioni del trattamento
- Non ho capito alcune delle statistiche che avete fatto in generale comunque il voto è 28 = 16 punti!

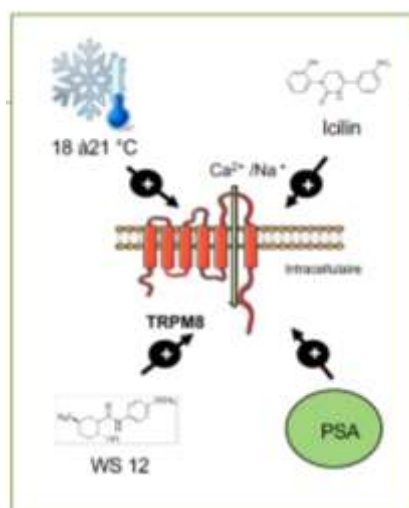
Cellular and Molecular Biophysics

MISURA DELLA CONCENTRAZIONE DEL CALCIO INTRACELLULARE PER LO STUDIO DELLE PROPRIETÀ DEI CANALI TRPM8

Bevilacqua Luigi, Biolatti Corrado, Brovia Manuel, Destro Elena, Garreffa Marcella, Lvova Ksenia, Magliano Piercarlo, Pedraza Riccardo, Uda Matteo, Vizzarro Arianna

Introduzione

I canali TRP (Transient Receptor Potential channel) sono canali ionici di membrana poco selettivi per cationi monovalenti e divalenti. Sono state rilevate 7 sottofamiglie, coinvolte nella percezione sensoriale e nella progressione tumorale. TRPM8, in particolare, è un termocettore attivato dal freddo, la cui funzionalità è regolata da diverse molecole, quali il mentolo o l'icilina (fig. 1)



La risoluzione non va bene non fate mai copia/incolla

Fig.1: TRP e suoi attivatori

In generale le didascalie vanno più dettagliate cosa vuol dire PSA e WS12? mancano anche nel testo

Le cellule oggetto di studio appartengono alla linea PC3, derivanti da pazienti affetti da carcinoma prostatico. Sulla base di ricerche condotte da Bidaux *et al.*, (2007) Gkika *et al.*, (2010); Gkika *et al.*, (2015), la forma tumorale in situ presenta un'over-espressione di TRPM8, mentre risultano down-regolati in fase di metastasi.

Al fine di misurare l'attività dei canali TRPM8 è stata utilizzata Fura-2, una sonda raziometrica fluorescente in grado di legare selettivamente ioni Ca^{2+} (fig. 2)

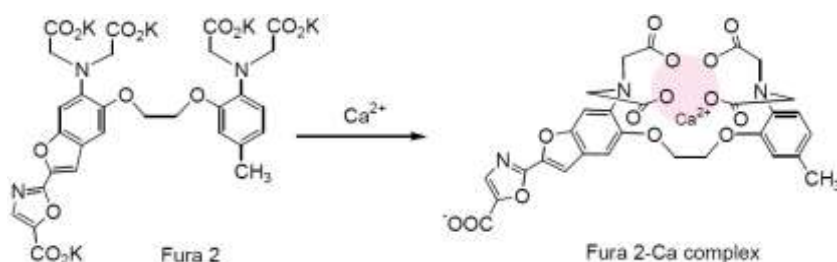


Fig.2: Struttura Fura-2 e Fura-2- Ca^{2+}

Fura-2 presenta uno spettro di assorbimento con 2 picchi di eccitazione, a 340nm e 380nm, dovuti al legame o meno con il Ca^{2+} , rispettivamente. L'emissione avviene a 510nm, indipendentemente dalla presenza o dall'assenza di Ca^{2+} . L'intensità di luce emessa (efficienza quantica) aumenta all'aumentare della $[\text{Ca}^{2+}]$ se l'eccitazione avviene a 340nm, mentre diminuisce eccitando a 380nm (fig. 3)

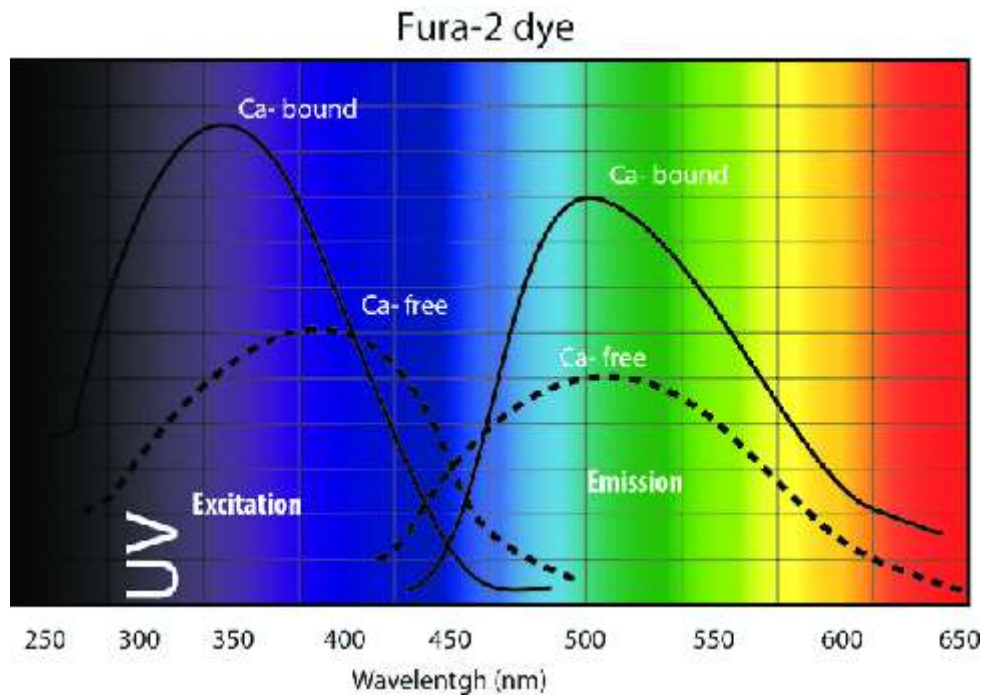


Fig.3: spettro di assorbimento ed emissione Fura-2

La figura non è chiarissima
sarebbe stato meglio spiegarla

Di solito si scrive Materiali e
Metodi

Metodi e materiali

Le colture cellulari preparate sono la PC3 WT e una linea trasfettata, PC3-TRPM8, la quale over-esprime i canali TRP. Le cellule sono state coltivate su terreno RPMI con aggiunta di 10% siero, gentamicina e glutammina. Al fine di calcolare il numero di cellule per ml è necessario contarle utilizzando la camera di Burkner. A tale scopo bisogna rimuovere il terreno ed effettuare un lavaggio in PBS in assenza di ioni calcio e magnesio, che ne impedirebbero il distacco. Alla piastra viene successivamente aggiunta la tripsina e incubata a 37°C. Una volta osservato con il microscopio ottico l'effettivo distacco delle cellule dalla piastra, la sospensione è trasferita in una nuova Falcon con una quantità di terreno circa il doppio rispetto alla quantità iniziale, per inattivare l'enzima.

Vengono di seguito prelevati 10µl e inseriti nella camera di Burkner, una lastra di vetro suddivisa in 9 quadrati di 1mm di lato, il cui volume interno è pari a $0,1\text{mm}^3 = 10^{-4}\text{ml}$ (fig. 4). Sono stati contati 5 quadrati all'interno delle 2 camere e calcolata la media per ciascun quadrato. La media delle cellule contate è 41 per la linea PC3 e 40 per la linea PC3-TRPM8. Dalla media si calcola il numero di cellule/ml.

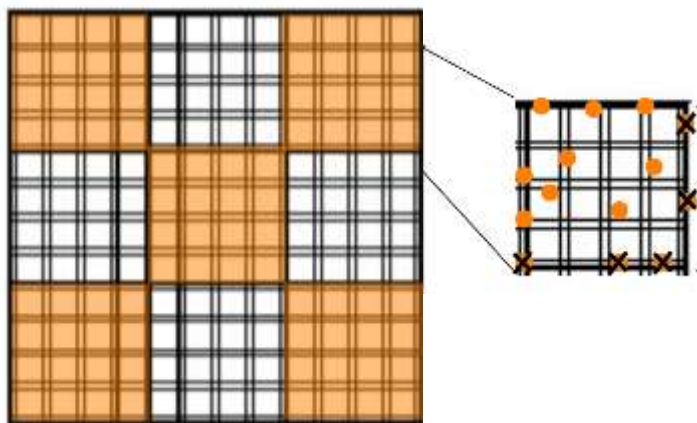


Fig. 4 Camera di Burkholder

Linea cellulare	Media	cell/ml	Cell tot V=4ml
PC3	41	41×10^4	$(41 \times 4) \times 10^4 = 164 \times 10^4$
PC3TRPM8	40	40×10^4	$(40 \times 4) \times 10^4 = 160 \times 10^4$

La sospensione viene centrifugata per 5' a 1000 RPM, dopodiché viene rimosso il surnatante e risospeso il pellet in 1ml di terreno. Per ottenere una sospensione di 5×10^4 cellule in 1ml di terreno vengono prelevati 33 μ l di sospensione PC3-TRPM8 e 30 μ l di sospensione PC3 e trasferiti in una piastra con 1,5ml di terreno. Le due linee cellulari sono state incubate a 37°C per 48 ore.

Linea cellulare		Volume prelevato
PC3	$164 \times 10^4 : 1 \text{ ml} = 5 \times 10^4 : x$	$x = 30 \mu\text{l}$
PC3TRPM8	$160 \times 10^4 : 1 \text{ ml} = 5 \times 10^4 : x$	$x = 33 \mu\text{l}$

Si procede con l'imaging del Ca^{2+} : i campioni vengono incubati per circa 30-45' con 2 μ l di Fura-2. Prima di essere sottoposti all'analisi con il microscopio a fluorescenza, viene aggiunta la soluzione fisiologica Tyrode standard per stabilizzare il pH (Tabella 1)

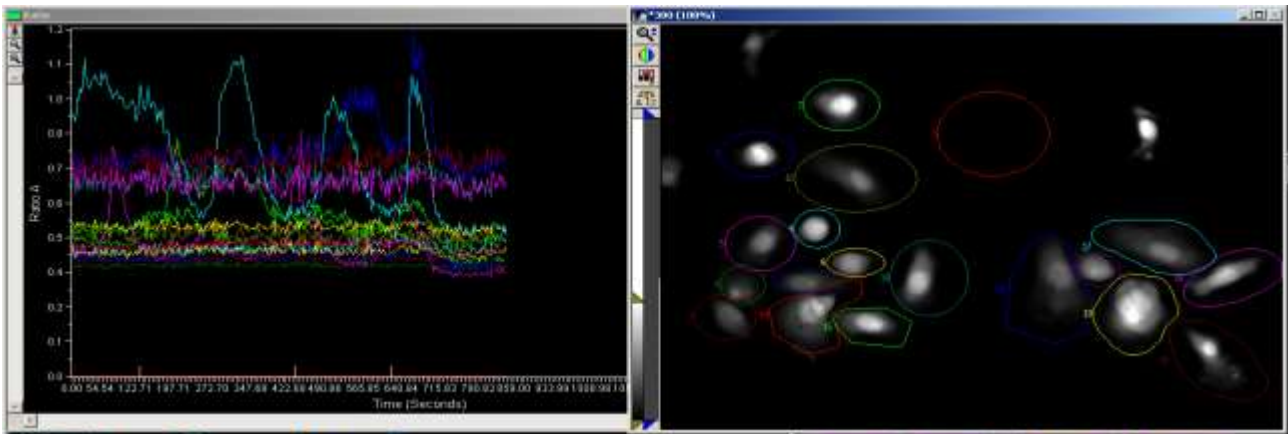
	mM	MW	g/l
NaCl	154	58,44	8,44
CaCl_2	2	147,02	0,29
KCl	4	74,56	0,30
MgCl_2	1	STOCK 4,9M	
HEPES	5	238	1,19
Glucose	5,5	180,2	0,99
pH(+NaOH)	7,4		

Tabella1: composizione Tyrode standard

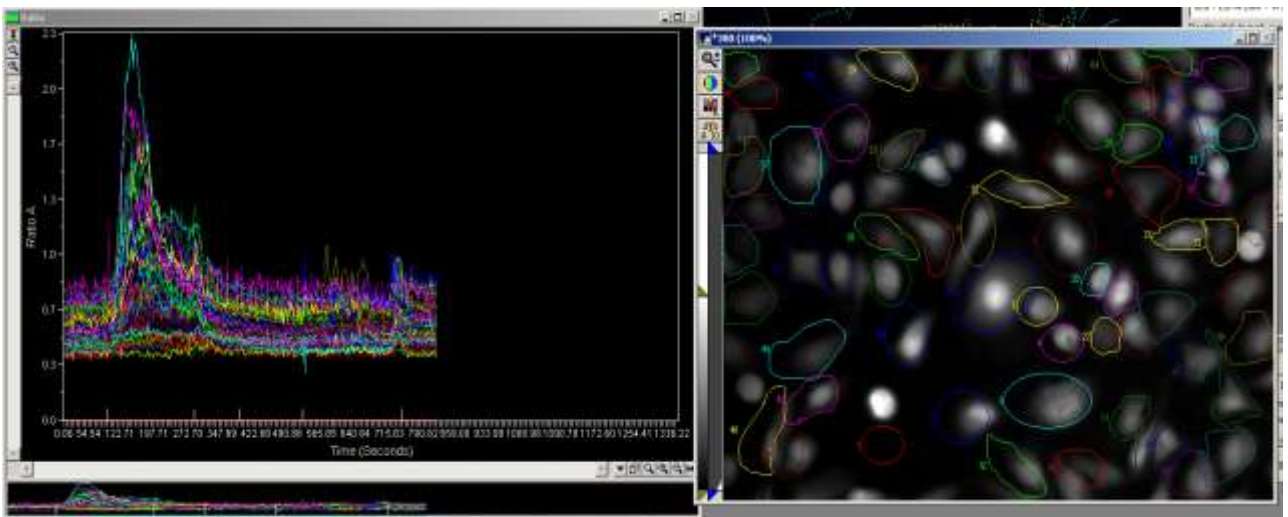
Si effettua una prima misura eccitando le cellule a 340 nm e 380 nm mentre la rilevazione viene effettuata a 510 nm. Viene selezionata un'area vuota per approssimare il valore di background e le cellule responsive per valutare la ratio tra le due lunghezze d'onda, in modo tale da ridurre il background ed eventuali effetti aspecifici quali il photobleaching.

La linea PC3 viene trattata con soluzione fisiologica Tyrode standard per 30 cicli, per i successivi 100 cicli oltre alla soluzione fisiologica vengono aggiunti 25µl di agonista WS-12, in grado di stimolare selettivamente i canali TRPM8. In fine viene effettuato un lavaggio con soluzione fisiologica.

attenzione: se riportate solo i dati non date le informazioni sulla concentrazione! Il dato importante è la concentrazione finale di WS12



Gli stessi passaggi vengono ripetuti per la linea PC3-TRPM8, successivamente vengono somministrate 2 soluzioni fisiologiche zero calcio, di cui una con l'agonista aggiunto per circa 100 cicli. Infine viene effettuato un lavaggio con soluzione Tyrode standard Ca^{2+} free.

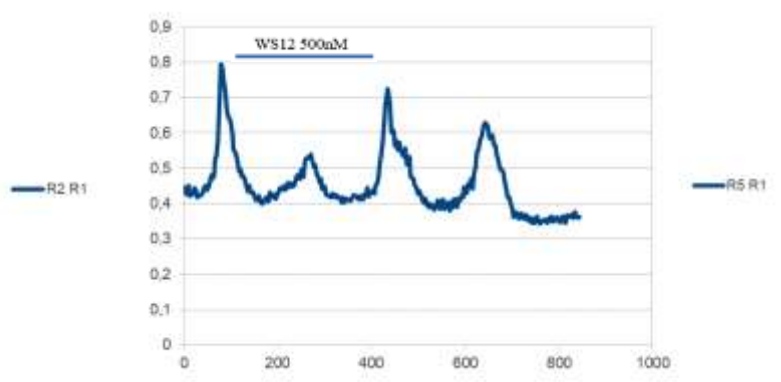
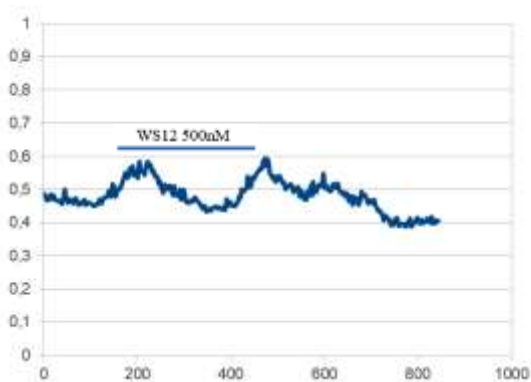


Risultati e analisi dati

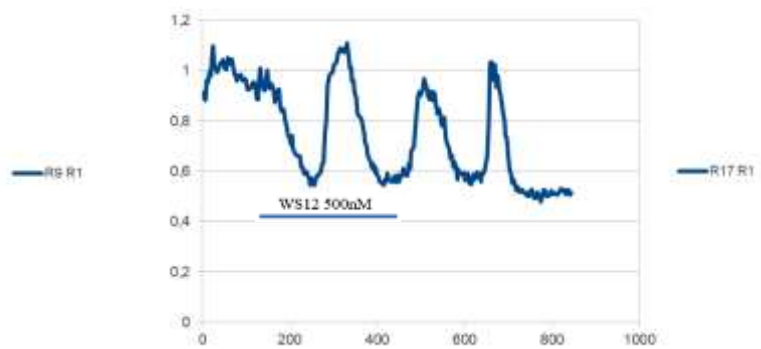
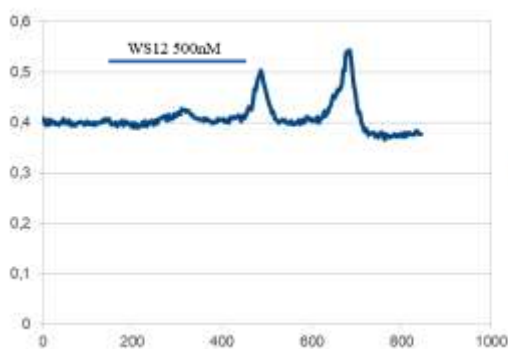
Tramite l'utilizzo del software Excel sono state calcolate le percentuali di risposta in seguito a stimolazione con WS-12 500nM:

	% risposta
PC3 WT	6,67 (1/15)
PC3-TRPM8 Ca ²⁺	79,17 (57/72)
PC3-TRPM8 \emptyset Ca ²⁺	33,4 (24/72)

Originariamente le PC3 WT erano 19 ma ne sono state escluse 4 (R2, R5, R9, R17) in quanto dal grafico e dai risultati ottenuti si osserva un comportamento oscillante sia in presenza che in assenza di agonista, mentre le PC3-TRPM8 sono state tutte considerate.



Quando presentate un grafico è necessario indicare sempre a cosa corrispondono i numeri sugli assi.



Per effettuare l'analisi dell'ampiezza del picco di risposta in seguito a stimolazione con WS-12 500nM si è considerata la differenza tra il valore massimo di segnale nell'intervallo di azione dell'agonista e il valore medio basale di 10 valori prima dell'aggiunta dell'agonista. Di seguito sono riportati i valori di tutte le cellule:

PC3					
Cellula2	0,03552	Cellula9	0,081772	Cellula14	0,312806
Cellula3	0,039648	Cellula10	0,022494	Cellula15	0,096467
Cellula5	0,039875	Cellula11	0,042233	Cellula17	0,062342
Cellula6	0,023614	Cellula12	0,024518	Cellula18	0,032196
Cellula7	0,014029	Cellula13	0,031643	Cellula19	0,10238

PC3-TRPM8 Ca2+							
Cellula1	0,942	Cellula19	0,963	Cellula37	0,136	Cellula55	0,129
Cellula2	0,565	Cellula20	0,234	Cellula38	0,181	Cellula56	1,854
Cellula3	0,490	Cellula21	0,687	Cellula39	0,390	Cellula57	1,406
Cellula4	0,085	Cellula22	0,177	Cellula40	0,269	Cellula58	0,034
Cellula5	0,813	Cellula23	0,791	Cellula41	0,772	Cellula59	0,079
Cellula6	0,313	Cellula24	0,578	Cellula42	0,409	Cellula60	0,608
Cellula7	0,349	Cellula25	0,418	Cellula43	0,767	Cellula61	0,295
Cellula8	0,060	Cellula26	0,101	Cellula44	0,818	Cellula62	0,460
Cellula9	0,032	Cellula27	0,367	Cellula45	1,256	Cellula63	0,361
Cellula10	0,599	Cellula28	0,112	Cellula46	0,345	Cellula64	0,139
Cellula11	0,632	Cellula29	0,139	Cellula47	0,044	Cellula65	0,072
Cellula12	0,625	Cellula30	0,448	Cellula48	0,770	Cellula66	0,524
Cellula13	0,228	Cellula31	0,795	Cellula49	1,250	Cellula67	0,593
Cellula14	0,058	Cellula32	0,970	Cellula50	1,412	Cellula68	0,095
Cellula15	0,959	Cellula33	0,477	Cellula51	0,406	Cellula69	0,881
Cellula16	0,135	Cellula34	1,157	Cellula52	0,061	Cellula70	0,415
Cellula17	0,075	Cellula35	0,659	Cellula53	0,190	Cellula71	0,201
Cellula18	0,084	Cellula36	1,036	Cellula54	1,160	Cellula72	0,598

PC3-TRPM8 \emptyset Ca2+							
Cellula1	0,060	Cellula19	0,058	Cellula37	0,162	Cellula55	0,429
Cellula2	0,057	Cellula20	0,009	Cellula38	0,433	Cellula56	0,025
Cellula3	0,075	Cellula21	0,020	Cellula39	0,120	Cellula57	0,069
Cellula4	0,231	Cellula22	0,127	Cellula40	0,089	Cellula58	0,103
Cellula5	0,135	Cellula23	0,068	Cellula41	0,087	Cellula59	0,111
Cellula6	0,091	Cellula24	0,058	Cellula42	0,259	Cellula60	0,051
Cellula7	0,195	Cellula25	0,130	Cellula43	0,037	Cellula61	0,023
Cellula8	0,280	Cellula26	0,080	Cellula44	0,018	Cellula62	0,085
Cellula9	0,283	Cellula27	0,132	Cellula45	0,024	Cellula63	0,259
Cellula10	0,069	Cellula28	0,243	Cellula46	0,006	Cellula64	0,088
Cellula11	0,103	Cellula29	0,346	Cellula47	0,318	Cellula65	0,169
Cellula12	0,038	Cellula30	0,069	Cellula48	0,290	Cellula66	0,017
Cellula13	0,080	Cellula31	0,159	Cellula49	0,042	Cellula67	0,066
Cellula14	0,165	Cellula32	0,019	Cellula50	0,024	Cellula68	0,052
Cellula15	0,130	Cellula33	0,053	Cellula51	0,033	Cellula69	0,051
Cellula16	0,236	Cellula34	0,038	Cellula52	0,129	Cellula70	0,116
Cellula17	0,071	Cellula35	0,183	Cellula53	0,038	Cellula71	0,102
Cellula18	0,219	Cellula36	0,076	Cellula54	0,041	Cellula72	0,064

Di seguito sono riportati i valori relativi alle sole cellule responsive:

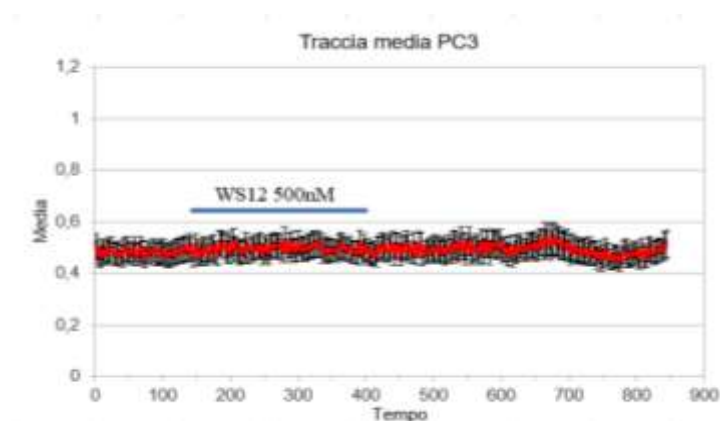
PC3	
Cellula11	0,312

PC3-TRPM8 Ca2+					
Cellula1	0,942	Cellula27	0,367	Cellula48	0,770
Cellula2	0,565	Cellula28	0,112	Cellula49	1,250
Cellula3	0,490	Cellula30	0,448	Cellula50	1,412
Cellula5	0,813	Cellula31	0,795	Cellula51	0,406
Cellula6	0,313	Cellula32	0,970	Cellula53	0,190
Cellula7	0,349	Cellula33	0,477	Cellula54	1,160
Cellula10	0,599	Cellula34	1,157	Cellula55	0,129
Cellula11	0,632	Cellula35	0,659	Cellula56	1,854
Cellula12	0,625	Cellula36	1,036	Cellula57	1,406
Cellula13	0,228	Cellula37	0,136	Cellula60	0,608
Cellula15	0,959	Cellula38	0,181	Cellula61	0,295
Cellula16	0,135	Cellula39	0,390	Cellula63	0,361
Cellula19	0,963	Cellula40	0,269	Cellula64	0,139
Cellula20	0,234	Cellula41	0,772	Cellula66	0,524
Cellula21	0,687	Cellula42	0,409	Cellula67	0,593
Cellula22	0,177	Cellula43	0,767	Cellula69	0,881
Cellula23	0,791	Cellula44	0,818	Cellula70	0,415
Cellula24	0,578	Cellula45	1,256	Cellula71	0,201
Cellula25	0,418	Cellula46	0,345	Cellula72	0,598

PC3-TRPM8 \emptyset Ca2+							
Cellula4	0,231	Cellula16	0,236	Cellula35	0,183	Cellula48	0,290
Cellula5	0,135	Cellula18	0,219	Cellula37	0,162	Cellula52	0,129
Cellula7	0,195	Cellula22	0,127	Cellula38	0,433	Cellula55	0,429
Cellula9	0,283	Cellula25	0,130	Cellula39	0,120	Cellula63	0,259
Cellula14	0,165	Cellula28	0,243	Cellula42	0,259	Cellula65	0,169
Cellula15	0,130	Cellula31	0,159	Cellula47	0,318	Cellula71	0,102

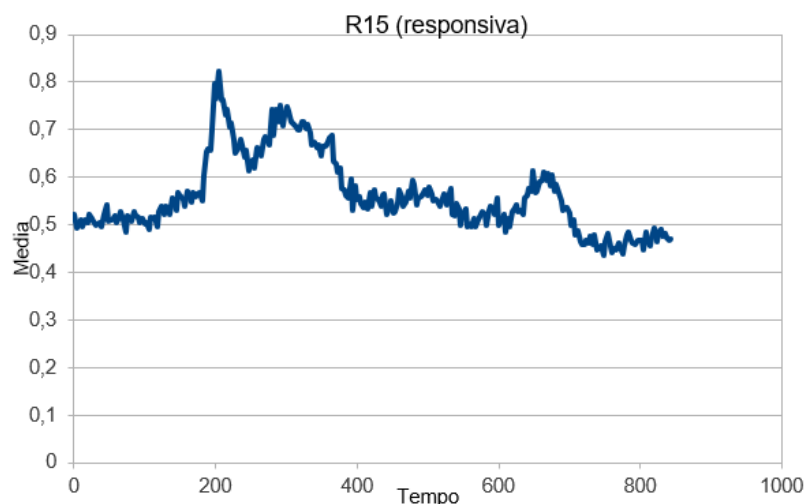
È stata successivamente ottenuta la traccia media di tutte le cellule (PC3) con il relativo errore standard e il grafico relativo alla singola cellula responsiva (R15)

unità di misura???



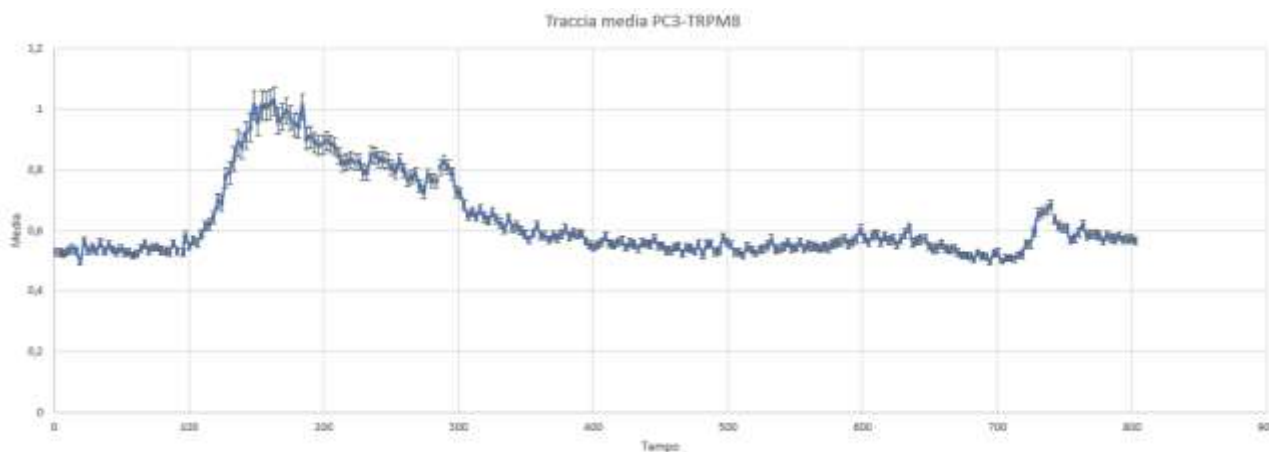
unità di misura???

Mancano le unità di misura e la notazione del trattamento

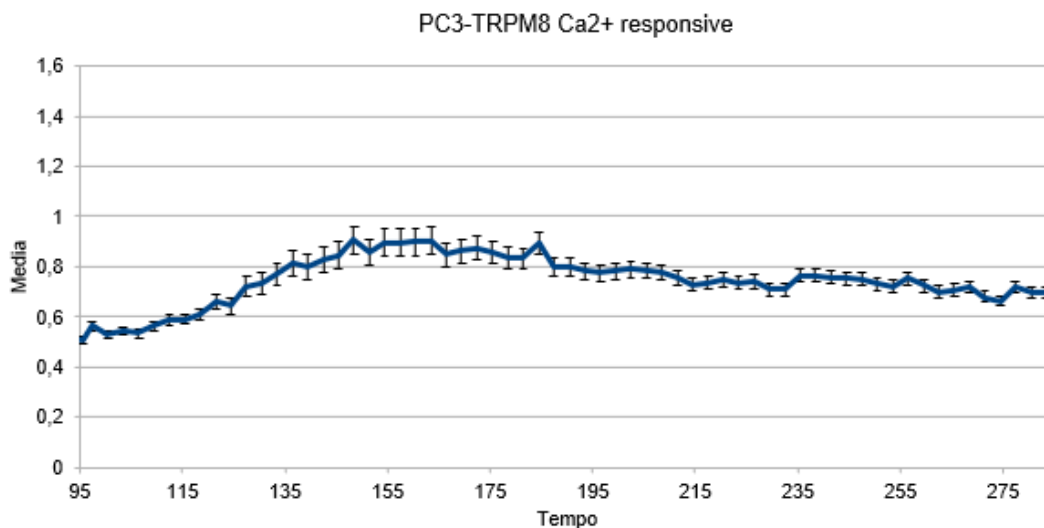


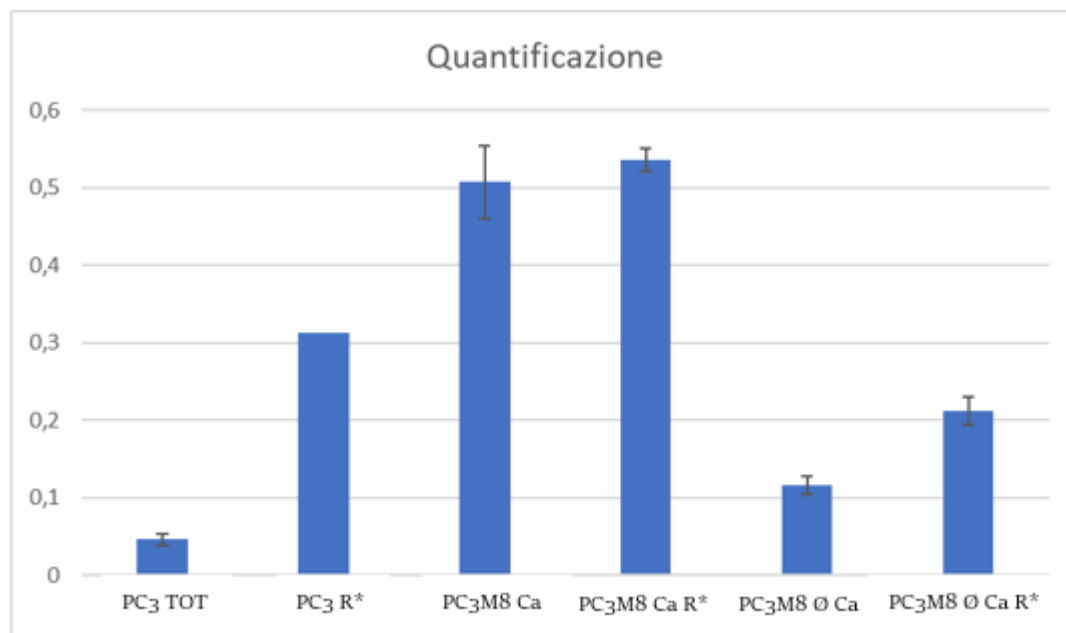
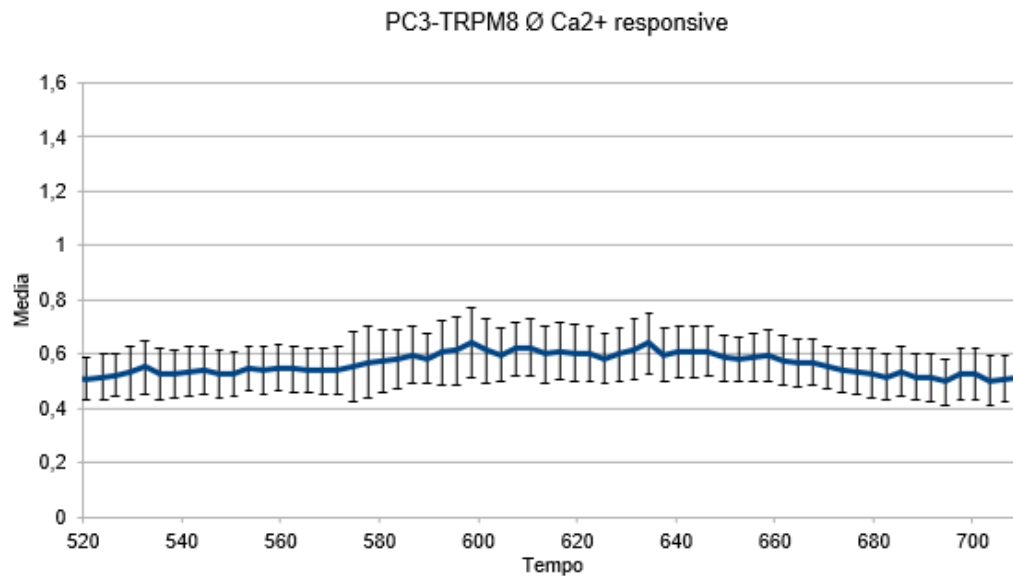
È stata ottenuta la traccia media anche per le cellule PC3-TRPM8 (con e senza Ca^{2+}) con il relativo errore standard e il grafico relativo alle sole cellule responsive in entrambe le condizioni

Mancano le unità di misura e la notazione del trattamento



Non capisco cosa sia questo grafico...le cells responsive hanno una risposta più bassa della media??? Ho capito bene? Non mi sembra possibile





Nel grafico vengono indicate le medie dei picchi relativi alle 2 linee cellulari nelle diverse condizioni con il rispettivo errore standard.

R* = Cellule responsive. Nel caso delle PC3 l'unica responsiva è R15.

Per verificare la normalità della distribuzione relativa alle cellule PC3-TRPM8 responsive in presenza di Ca²⁺ è stato svolto il test di Kolmogorov-Smirnov:

p-value ottenuto = 1.332e-15

Essendo il p-value < 0.05 si rifiuta l'ipotesi nulla di normalità della distribuzione.

Per verificare la normalità della distribuzione relativa alle cellule PC3-TRPM8 responsive in assenza di Ca^{2+} è stato svolto il test di Shapiro, poiché la taglia del campione è < 30 :

p-value = 0.01282

Essendo il p-value < 0.05 si rifiuta l'ipotesi nulla di normalità della distribuzione.

È stato successivamente svolto il test di Wilcoxon per la differenza tra le medie delle ampiezze dei picchi relative alle PC3 responsive e le PC3-TRPM8 responsive in presenza e in assenza di Ca^{2+} : **Cioè avete fatto la statistica con una cellula??? Forse intendete PC3 TOT**

p-value = $9.477\text{e-}07$ (in presenza di Ca^{2+})

p-value = $7.629\text{e-}05$ (in assenza di Ca^{2+})

**perchè avete valutato la statistica tra PC3 e e PC3M8
0Ca2+??**

Essendo in entrambi i casi i p-value < 0.05 si rifiuta l'ipotesi nulla di uguaglianza tra le medie.

CONCLUSIONI E DISCUSSIONE:

Confrontando i valori relativi a PC3 totali e PC3-TRPM8 Ca^{2+} totali si nota una risposta maggiore in quest'ultima linea cellulare, dovuta alla over-espressione dei canali TRPM8, che in presenza dell'agonista favoriscono l'ingresso di Ca^{2+} nella cellula.

Un'osservazione analoga è deducibile confrontando i valori relativi di PC3 R* e PC3-TRPM8 Ca^{2+} R*. Essendo responsiva solo una cellula tra le PC3 (R15) le analisi potrebbero non essere molto accurate e sarebbe necessario ripetere l'esperimento con un numero maggiore di cellule.

Si nota nell'analisi condotta in assenza di Ca^{2+} una risposta maggiore tra le cellule PC3-TRPM8 R* rispetto alle cellule PC3-TRPM8 totali: questo è dovuto al rilascio di Ca^{2+} dagli store intracellulari in seguito alla stimolazione con l'agonista, con conseguente incremento della $[\text{Ca}^{2+}]$ citosolica misurabile con la sonda Fura-2.

La frase non è chiarissima. Altra domand aavete fatto la statistica? la difefrenza è significativa?