UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense
Unità di Istologia ed Embriologia

Modello 2D *in vitro* di HaCaT differenziate per lo studio delle fasi precoci della psoriasi e delle vescicole extracellulari

Relatore:
Prof.ssa Federica Riva

Tesi Sperimentale di
Beatrice Barco

Matricola 562562

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

GLOSSARIO 1

INTRODUZIONE 3

1. La cute e la funzione di barriera epidermica 3

1.1 L'epidermide 4

1.2 Il differenziamento epidermico 4

1.3 La barriera cutanea e le giunzioni 6

2. Modelli sperimentali *in vitro* 7

2.1 Linea cellulare HaCaT: origini e proprietà 7

2.2 Caratteristiche morfologiche e funzionali delle cellule HaCaT 8

2.2.1 Transizione morfologica durante il differenziamento 8

2.2.2 Espressione sequenziale di marcatori proteici 9

2.2.3 Profilo secretorio e reattività infiammatoria 9

2.3 Potenzialità e limiti del modello 2D di cellule HaCaT 9

3. L'ambiente psoriasico 10

3.1 Istopatologia: alterazione del differenziamento e disfunzione della barriera 11

3.2 Ambiente pro-infiammatorio 12

3.3 Meccanismi di morte cellulare 13

4. Vescicole extracellulari (EVs) 14

4.1 Biogenesi e classificazione 14

4.2 EVs nel *cross-talk* psoriasico 15

5. Approcci anti-infiammatori protettivi di sostanze biogene 17

5.1 Proprietà biologiche della Curcuma 17

5.2 Varietà del genere Curcuma 18

5.3 *Curcuma caesia* Roxb. (curcuma blu) 19

STATO DELL'ARTE 20

SCOPO DEL LAVORO 28

MATERIALI E METODI 29

1. Modello bidimensionale *in vitro* 30

1.1 Coltura e mantenimento delle cellule HaCaT 30

1.2 Induzione del differenziamento cellulare con $CaCl_2$ 30

1.3 Trattamento con miscela di citochine proinfiammatorie 31

1.4 Isolamento delle vescicole extracellulari (EVs) 31

1.5 Trattamento delle cellule HaCaT con EVs 32

1.6 Preparazione dell'estratto di *Curcuma caesia* Roxb. 32

1.7 Trattamento delle cellule HaCaT con l'estratto di *Curcuma caesia* 33

1.8 Saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU) 33

2. Immunocitochimica 33

2.1 Saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU) per l'analisi citochimica dell'attività proliferativa 33

2.2 Immunomarcatura delle proteine di giunzione *TJs* e *marker* di differenziamento 34

3. Western blot 35

4. Citometria a flusso 37

4.1 Saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU) per l'analisi dell'attività proliferativa in citometria a flusso 37

RISULTATI 38

1. Effetto dello stimolo psoriasico (MIX) sul modello di cellule HaCaT differenziate 38

1.1 Analisi Morfologica in microscopia ottica 38

1.2 Analisi dell'attività proliferativa 39

1.3 Giunzioni cellulari occludenti e *Tight Junctions (TJs)* 40

1.3.1 Claudina-1 (CLDN-1) 40

1.3.2 Zonula Occludens-1 (ZO-1) 42

1.4 Analisi del differenziamento cellulare: valutazione della cheratina K10 43

2. Effetto delle Vescicole Extracellulari (EVs) sul modello HaCaT differenziato 45

2.1 Aspetti morfologici cellulari 45

2.2 Attività proliferativa 46

2.3 Giunzioni cellulari: *TJs* 49

2.3.1 Claudina-1 (CLDN-1) 49

2.3.2 Zonula Occludens-1 (ZO-1) 50

2.4 Analisi del differenziamento attraverso la cheratina K10 52

3. Effetto biologico di una sostanza biogena naturale (*Curcuma caesia* Roxb.) sul modello di cellule HaCaT differenziate 54

3.1 Attività proliferativa 55

3.2 Giunzioni cellulari occludenti *(TJs)* 56

3.3 Differenziamento 58

DISCUSSIONE 60

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE 63

BIBLIOGRAFIA 65

RINGRAZIAMENTI 73

GLOSSARIO

AMP: Peptidi antimicrobici *(Antimicrobial peptides)*

BrdU: 5-bromo-2'-desossiuridina *(5-bromo-2'-deoxyuridine)*

$CaCl_2$: Cloruro di calcio

CCRE: Estratto del rizoma di *Curcuma caesia (Curcuma caesia Rhizome Extract)*

CLDN-1: Claudina 1

Cocktail: miscela di citochine proinfiammatorie

DAMPs: Modelli molecolari associati al danno *(Damage-Associated Molecular Patterns)*

DCQI: Questionario sulla qualità della vita in dermatologia *(Dermatology Life Quality Index)*

DMEM: Terreno di Eagle modificato da Dulbecco *(Dulbecco's Modified Eagle Medium)*

DMSO: Dimetilsolfossido *(Dimethyl sulfoxide)*

EtOH: Etanolo *(Ethanol)*

EVs: Vescicole extracellulari *(Extracellular Vesicles)*

FBS: Siero Fetale Bovino *(Fetal Bovine Serum)*

FITC: Fluoresceina isotiocianato *(Fluorescein isothiocyanate)*

Flask: fiasca sterile per colture cellulari

HaCaT: Linea di cheratinociti umani immortalizzati spontaneamente *(Human adult Calcium high Temperature)*

HC: Alto contenuto di calcio *(High Calcium)*

IL: Interleuchina *(Interleukin)*

ImageJ: *Software* per l'analisi digitale delle immagini

K10: Cheratina 10

LC: Basso contenuto di calcio *(Low Calcium)*

Markers: Marcatori molecolari cellulari

MHC: Complesso maggiore di istocompatibilità *(Major Histocompatibility Complex)*

MIX: Miscela citochinica psoriasica (IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα)

MMPs: Metalloproteinasi della matrice *(Matrix Metalloproteinases)*

***Multiwell*:** Piastra multipozzetto per colture cellulari

MVB: Corpo multivescicolare *(Multivesicular bodies)*

NHKs: Cheratinociti primari umani normali *(Normal Human Keratinocytes)*

PASI: Indice di gravità dell'area psoriasica *(Psoriasis Area and Severity Index)*

PBS: Tampone fosfato salino *(Phosphate Buffered Saline)*

PFA: Paraformaldeide *(Paraformaldehyde)*

PTA: Soluzione tampone di blocco (PBS, Tween-20, Albumina)

TEM: Microscopia elettronica a trasmissione *(Transmission Electron Microscopy)*

TJ: Giunzioni strette *(Tight Junctions)*

TNFα: Fattore di necrosi tumorale alfa *(Tumor Necrosis Factor-alpha)*

ZO-1: *Zonula Occludens*-1

INTRODUZIONE

1. La cute e la funzione di barriera epidermica

La cute, o tegumento, è l'organo più esteso del corpo umano. La sua funzione principale è di natura protettiva, agendo come una barriera per impedire la penetrazione di agenti chimici tossici e patogeni infettivi. Protegge i tessuti dai danni indotti dai raggi ultravioletti e limita la perdita di acqua e soluti. Inoltre, ha un ruolo chiave nella termoregolazione, nella riserva energetica, nella percezione sensoriale e nella sintesi di molecole bioattive. [1–5]

Dal punto di vista anatomico, la cute è organizzata gerarchicamente in tre strati principali sovrapposti e funzionalmente interconnessi (Figura 1). L'*epidermide*, più superficiale, è un epitelio squamoso pluristratificato cheratinizzato auto-rinnovante, costituito da cellule epiteliali specializzate chiamate cheratinociti che, durante il processo di differenziamento, si dispongono in file ordinate su più strati, cambiando la morfologia da colonnare (nello strato basale) a poliedrica a livello dello strato spinoso, per poi appiattirsi nello strato corneo. Il *derma*, il tessuto sottostante l'epidermide, rappresenta la componente connettivale, riccamente vascolarizzata e innervata, composta da una popolazione cellulare eterogena e dalla matrice extracellulare (ECM) generata per lo più da fibroblasti, che fornisce alla cute forza ed elasticità. Lo strato più profondo, l'*ipoderma*, si compone principalmente di tessuto adiposo e funge da isolante termico, ammortizzatore meccanico contro gli urti e principale riserva energetica del corpo. [1,3,5]

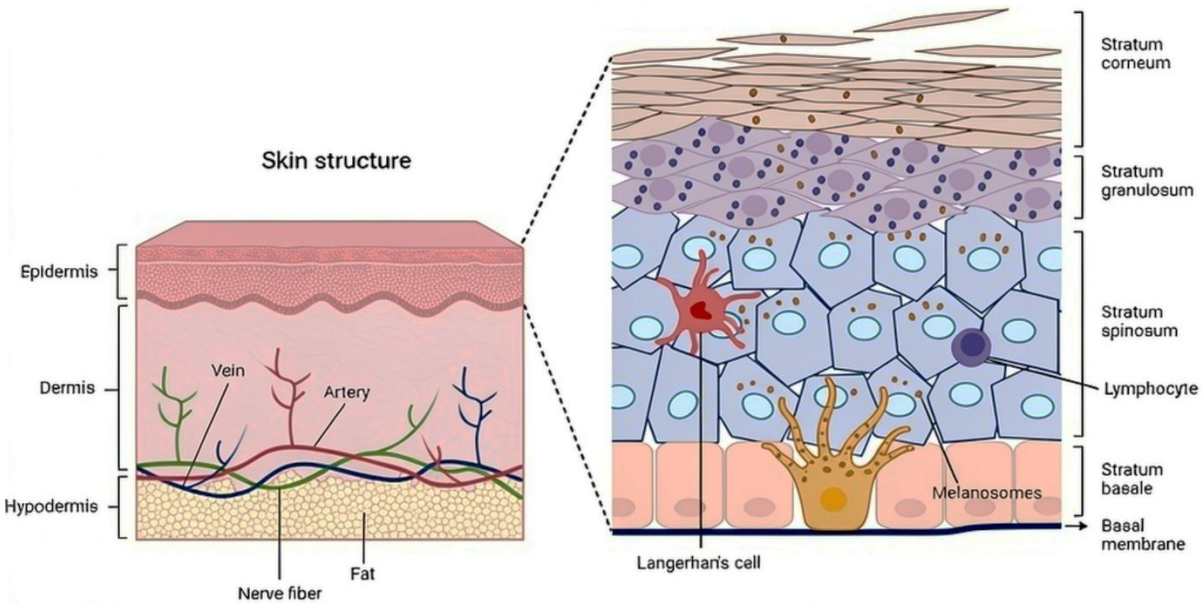


Figura 1: rappresentazione schematica dell'istoarchitettura della cute [3]

1.1 L'epidermide

L'epidermide si organizza in diversi strati (Figura 1), costituendo cinque zone distinte in cui i cheratinociti mostrano differenti stadi di differenziamento. Dallo strato più profondo verso la superficie, sono indicati come: strato basale, strato spinoso, strato granuloso, strato lucido e strato corneo. [1,3] I cheratinociti sono cellule capaci di sintetizzare citocheratine, proteine dei filamenti intermedi specifici delle cellule epiteliali, i tonofilamenti, che si assemblano in eteropolimeri, formando il citoscheletro, struttura capace di proteggere le cellule da stress meccanici e chimici. La coesione tra cheratinociti è garantita da complessi giunzionali come i desmosomi, giunzioni ellissoidali puntiformi che collegano meccanicamente le membrane plasmatiche di cellule adiacenti, e le giunzioni occludenti (*Tight Junctions, TJs*). [2] A livello dello strato basale ancorato alla lamina basale sono presenti nicchie di cheratinociti ad uno stadio staminale indifferenziato che attraverso divisioni mitotiche costanti, garantiscono il rinnovo del tessuto e sostengono il processo di citomorfosi cornea. Qui, i cheratinociti iniziano un percorso di trasformazione, caratterizzato dalla modifica del loro profilo biochimico e morfologico. La proliferazione nello strato basale deve bilanciare la perdita delle cellule superficiali, terminalmente differenziate e non vitali. L'epidermide ospita una comunità cellulare eterogenea in cui i cheratinociti interagiscono con altre popolazioni specializzate. I melanociti entrano in contatto, attraverso i loro prolungamenti dendritici, con circa 36-40 cheratinociti adiacenti, nei quali trasferiscono melanosomi ricchi di melanina, pigmento che si accumula a livello perinucleare per schermare il DNA dai danni indotti dalle radiazioni ultraviolette (UV). [3] Le cellule di Langerhans agiscono come sentinelle del sistema immunitario, e le cellule di Merkel sono responsabili della trasduzione degli stimoli sensoriali tattili. [5]

1.2 Il differenziamento epidermico

Il differenziamento epidermico rappresenta un complesso meccanismo di maturazione cellulare unidirezionale che converte i cheratinociti mitoticamente attivi dello strato basale in corneociti anucleati (Figura 2). Durante questo processo, non avviene solamente un cambio di morfologia: si assiste ad uno *switch* fenotipico da uno stato proliferativo ad uno differenziato, accompagnato dall'espressione sequenziale e compartimentalizzata di specifiche proteine strutturali e marcatori. [1,6] I cheratinociti dello strato basale, dotati di attività mitotica e staminalità, esprimono selettivamente filamenti intermedi caratteristici di uno stato indifferenziato, in particolare una coppia di cheratine a basso peso molecolare: K5 e K14. Una volta abbandonata la nicchia basale, le cellule iniziano il percorso verso il differenziamento terminale.

A livello dello strato spinoso, le cellule da cubiche cominciano ad assumere una morfologia poligonale, e si osserva una riduzione dell'espressione delle cheratine basali, a favore della coppia K1 e K10, *markers* precoci del differenziamento soprabasale. [2,4] Nel momento in cui i cheratinociti raggiungono lo strato granuloso, si appiattiscono e iniziano a sintetizzare precursori utili per la successiva cornificazione, tra cui pro-filaggrina e involucrina.

Il massimo grado di differenziamento viene raggiunto a livello dello strato corneo, dove i cheratinociti vengono trasformati in corneociti, andando incontro ad una forma specializzata di morte programmata che comporta la perdita del nucleo e di tutti gli organelli citoplasmatici. [1] Durante gli stadi terminali del processo, la pro-filaggrina viene defosforilata e proteolizzata in filaggrina attiva, la quale agisce promuovendo l'aggregazione dei filamenti intermedi di cheratina in macrofibrille parallele, determinando il collasso strutturale della cellula e la formazione dello scheletro interno del corneocito. In parallelo, viene espressa l'involucrina, proteina strutturale che agisce come una sorta di "impalcatura" molecolare su cui vanno ad accumularsi altre proteine e lipidi, creando l'involucro cornificato, una barriera insolubile che sostituisce la membrana plasmatica. [3,6,7] Alterazioni relative a questo complesso processo possono compromettere fatalmente l'integrità strutturale dell'epidermide, ponendo le basi per l'instaurarsi di stati patologici iperproliferativi o infiammatori.

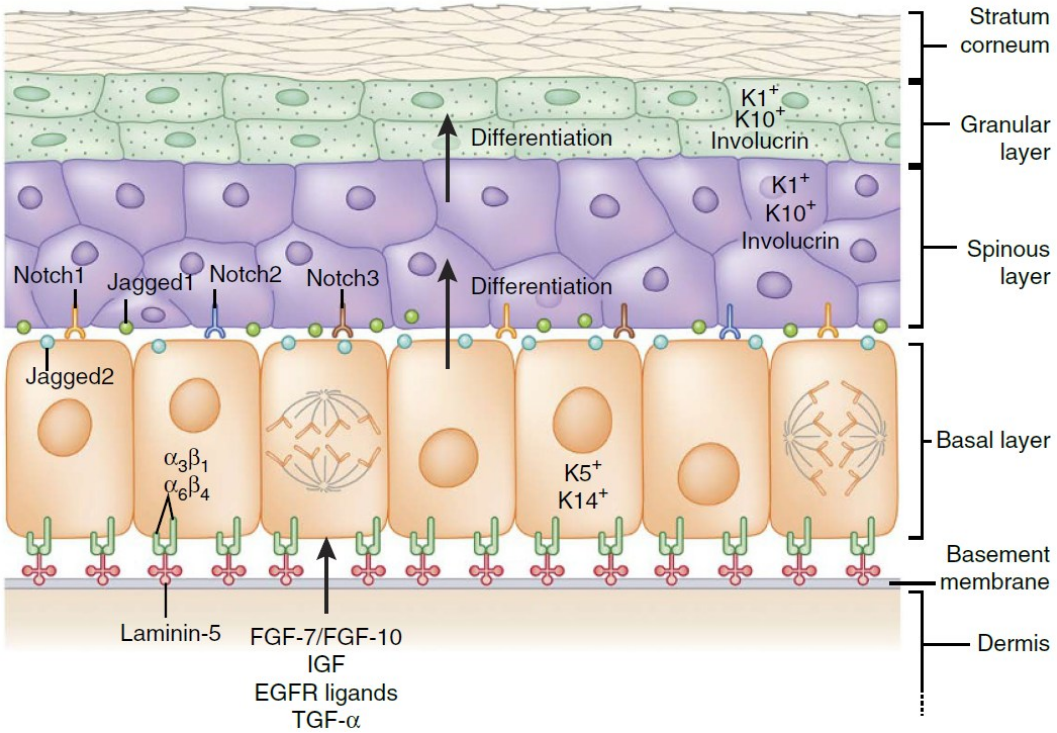


Figura 2: Organizzazione stratificata dell'epidermide e differenziamento dei cheratinociti lungo i diversi strati [8]

1.3 La barriera cutanea e le giunzioni

Le proprietà della barriera epidermica sono strettamente legate alla presenza delle *Tight Junctions* (TJ), o giunzioni serrate, sistemi proteici che compattano tra di loro i cheratinociti e i corneociti, in modo da regolare il traffico bidirezionale di acqua, ioni e soluti. [9] Questo tipo di giunzioni è costituito da proteine appartenenti a diverse famiglie proteiche (Figura 3). Tra le principali, vi è la famiglia delle Claudine (in particolare, Claudina-1 o CLDN-1), proteine transmembrana in grado di auto-assemblarsi attraverso interazioni *cis* e *trans* in lunghi filamenti. Inoltre, intervengono proteine come l'occludina e le molecole JAM-A, con la funzione di stabilizzare le giunzioni ed allo stesso tempo permettere alle cellule di mantenere la loro polarità. [9,10] Alcune proteine citoplasmatiche, tra cui *Zonula Occludens-1* (ZO-1), sono indispensabili per mettere in contatto la superficie cellulare con il macchinario metabolico interno, collegando fisicamente le proteine transmembrana al citoscheletro di actina (Figura 3). Attraverso queste interazioni, le TJ sono in grado di rispondere alle tensioni tissutali: in condizioni di stress meccanico, ZO-1 può andare incontro a variazioni conformazionali, attivando specifiche vie di segnalazione e regolando la proliferazione e la migrazione cellulare attraverso modulatori quali ATK ed ERK. [10,11]

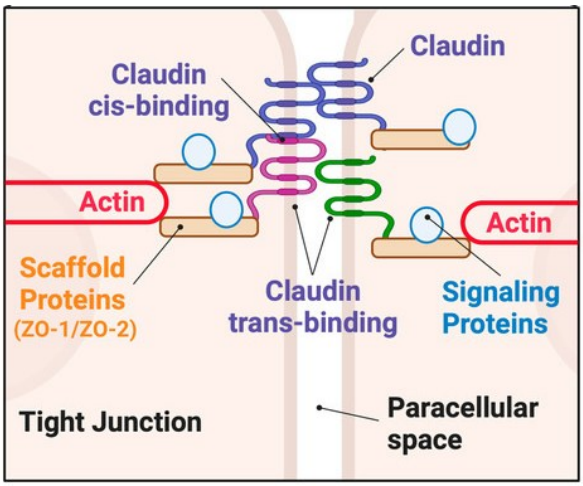


Figura 3: Rappresentazione schematica dell'organizzazione e della localizzazione delle proteine delle giunzioni strette nei contatti intercellulari epiteliali [10]

L'importanza fisiologica di questi meccanismi emerge chiaramente in condizioni patologiche quali la psoriasi. In questo contesto pro-infiammatorio si assiste ad un precoce rimodellamento del complesso giunzionale, caratterizzato dalla marcata riduzione dell'espressione di Claudina-1 e dalla perdita della corretta localizzazione di ZO-1 e occludina. Tali alterazioni compromettono l'organizzazione delle *Tight Junctions* e contribuiscono alla disorganizzazione dell'istoarchitettura epidermica e alla disfunzione della barriera epidermica, favorendo il mantenimento dello stato infiammatorio. [12]

2. Modelli sperimentali *in vitro*

La comprensione e l'approfondimento dei meccanismi molecolari alla base dell'omeostasi epidermica e delle patologie correlate richiede l'impiego di modelli sperimentali *in vitro* capaci di riprodurre fedelmente le proprietà biologiche e funzionali del tessuto nativo. [13]

Nonostante i cheratinociti umani primari (*Normal Human Keratinocytes,* NHKs) rappresentino il modello fisiologicamente più prossimo alla condizione *in vivo*, il loro utilizzo è limitato da una breve emivita in coltura che impedisce studi a lungo termine, dalla necessità di complessi terreni addizionati con fattori di crescita e da una marcata variabilità inter-donatore che può ostacolare la riproducibilità dei dati. Per ovviare a queste limitazioni, la ricerca dermatologica si avvale diffusamente della linea cellulare HaCaT, un modello di cheratinociti umani immortalizzati, capace di mantenere un programma di differenziamento terminale pressoché completo. [13–16]

2.1 Linea cellulare HaCaT: origini e proprietà

La linea cellulare HaCaT è stata definita come tale nel 1988 da Boukamp e Fusenig [14] utilizzando cheratinociti isolati dal distretto periferico sano circostante un melanoma escisso dalla regione dorsale di un paziente maschio di 62 anni. Il termine "HaCaT" deriva dalle condizioni di propagazione iniziali: cheratinociti da cute adulta umana (*Human adult*) coltivati a bassi livelli di calcio (Ca) ed elevata temperatura (T). [14]

Un elemento di particolare rilevanza nella biologia di queste cellule è rappresentato dalla natura della loro immortalizzazione, avvenuta spontaneamente in coltura senza l'induzione mediata da virus oncogeni, quali SV40 o HPV, o l'utilizzo di agenti trasformanti esogeni. Tale caratteristica è fondamentale poiché, diversamente dalle linee trasformate viralmente, le HaCaT non mostrano alterazioni fenotipiche che compromettono la capacità di differenziamento. [13,14]

Nonostante queste cellule presentino un corredo aneuploide ed un potenziale di crescita illimitato, che supera i 140 passaggi in coltura, sono relativamente stabili dal punto di vista citogenetico e conservano rilevanti proprietà biologiche per la ricerca sperimentale. [14] Sebbene la linea sia dotata di capacità di crescita clonogenica *in vitro*, essa preserva una natura rigorosamente non tumorigenica e non invasiva.

Le cellule HaCaT sono capaci di stratificarsi e formare strutture epidermiche in modelli organotipici 3D [14]. Inoltre, sono in grado di oscillare dinamicamente tra uno strato proliferativo di tipo basale e un fenotipo differenziato in risposta a stimoli di maturazione, quali la modulazione della concentrazione del calcio extracellulare. [13–16]

Questa plasticità fenotipica, unita alla capacità di proliferare in terreni di coltura convenzionali senza la necessità di particolari supporti cellulari o di complessi supplementi di crescita, definisce la linea cellulare HaCaT come un sistema standardizzato, versatile, ampiamente utilizzato per l'indagine dei meccanismi molecolari della rigenerazione epidermica e della segnalazione cellulare, per test farmacologici, per studi relativi all'infiammazione cutanea e patologie correlate. [13,15]

2.2 Caratteristiche morfologiche e funzionali delle cellule HaCaT

2.2.1 Transizione morfologica durante il differenziamento

La morfologia delle cellule HaCaT è altamente plastica e indica il loro stato biologico e differenziativo. Quando vengono coltivate a basse concentrazioni di calcio (*Low Calcium*, 0.03-0.09 mM) e mantenute a densità sub-confluenti (circa l'80%), esse mimano lo strato basale dell'epidermide. In tali condizioni, le cellule crescono come un monostrato di cellule appiattite ed allungate, assumendo una tipica forma "a fuso" (*spindle-shaped*). Presentano scarse giunzioni serrate intercellulari e possono apparire, occasionalmente, cellule giganti multinucleate. [13,14,16]

L'induzione del differenziamento, mediata dall'aumento della concentrazione di calcio extracellulare (*High Calcium*, > 1.2 mM) o il raggiungimento dello stato di sovra-confluenza inducono una transizione verso un fenotipo maturo. Le cellule HaCaT assumono una forma cuboidale (*cobblestone*), diventano più piccole e si impaccano densamente, formando giunzioni intercellulari robuste e iniziando la stratificazione. Nelle fasi finali, si può osservare la formazione di strutture simili a scaglie cornee sulla superficie della coltura. [13–15]

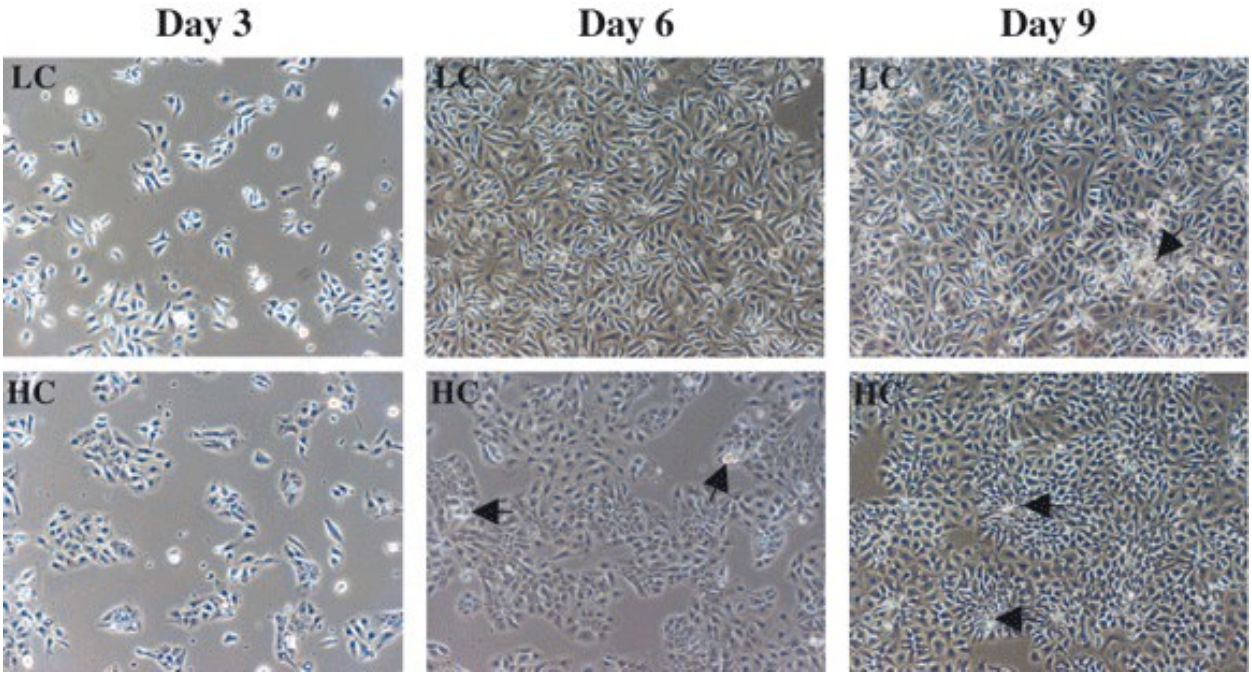


Figura 4: Cambiamenti morfologici evidenziati con microscopia a contrasto di fase in cellule HaCaT coltivate in terreno a basso (LC) o ad alto contenuto di calcio (HC). Le frecce indicano morfologie cellulari mature visibili sulla superficie. [16]

2.2.2 Espressione sequenziale di marcatori proteici

Sebbene nel modello 2D la stratificazione non risulti architettonicamente completa come *in vivo*, le cellule HaCaT esprimono marcatori proteici specifici, che correlano funzionalmente ai diversi strati epidermici. Nello stato proliferativo e di sub-confluenza, esprimono elevati livelli delle cheratine K14 e K5, *markers* principali dello strato basale indifferenziato; diversamente, tendono a ridursi man mano che la densità cellulare aumenta e il differenziamento procede. [13,15]

Con il progredire della maturazione e il raggiungimento della sovra-confluenza, aumenta significativamente l'espressione delle cheratine suprabasali K1 e K10. Le fasi finali del differenziamento terminale sono infine rappresentate dall'espressione di involucrina e filaggrina, proteine rilevabili nei livelli più superficiali delle colture stratificate, fondamentali per la costruzione dell'involucro cornificato e tipiche degli strati granuloso e corneo dell'epidermide *in vivo*. [13,15]

2.2.3 Profilo secretorio e reattività infiammatoria

Il modello HaCaT mostra una precisa correlazione funzionale tra lo stato di maturazione e la capacità di rispondere a diversi stimoli ambientali. La massima reattività infiammatoria e riparativa si osserva tipicamente nelle HaCaT allo stato basale. In risposta a citochine pro-infiammatorie quali TNFα e IL-1β, queste cellule rilasciano elevati livelli di mediatori chiave come CXCL8/IL-8, fondamentale per il reclutamento dei neutrofili, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), promotore dell'angiogenesi e della riparazione tissutale, MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase-9*), coinvolta nel rimodellamento della matrice extracellulare. Al contrario, le HaCaT più differenziate mostrano una drastica riduzione nella secrezione di questi mediatori, a favore della produzione della chemochina CCL22/MDC, implicata nelle fasi tardive di segnalazione immunitaria o di risoluzione della barriera cutanea. [15]

2.3 Potenzialità e limiti del modello 2D di cellule HaCaT

La linea cellulare HaCaT, coltivata in sistemi bidimensionali, costituisce un modello standardizzato che permette di seguire singoli aspetti biologici all'interno di situazioni sperimentali variabili, come l'effetto di singoli stimoli pro-infiammatori o di molecole farmacologiche, eliminando le interferenze biologiche che avvengono in un organismo complesso. [15,17]

I suoi vantaggi principali sono l'elevata riproducibilità e l'economicità delle procedure di mantenimento e propagazione. Queste caratteristiche permettono, per esempio, di sfruttare il modello per lo studio delle vie di segnalazione intracellulare indotte da citochine specifiche, quali TNF-α, IL-17 e IL-22. Tuttavia, il modello cellulare 2D presenta anche limiti intrinseci, legati all'impossibilità di replicare la complessità architettonica e strutturale della cute *in vivo*. La coltura bidimensionale non permette in genere ai cheratinociti di organizzarsi nel tipico assetto stratificato dell'epidermide, rendendo difficile la formazione di una barriera fisica completa. [15,17]

Inoltre, le colture 2D non riproducono l'eterogeneità cellulare tipica del tessuto nativo: in questo contesto viene meno il *cross-talk* epitelio-mesenchimale con i fibroblasti residenti nel derma, così come l'interazione con le popolazioni immunitarie e la rete vascolare. L'assenza dell'interfaccia aria-liquido (ALI) costituisce un ulteriore limite. Sebbene i modelli organotipici 3D e le tecnologie di biostampa avanzata cerchino di colmare questi aspetti, il modello 2D rimane uno strumento fondamentale per la ricerca di base. [18,19] Pur non essendo in grado di sostituire integralmente la complessità di un epitelio stratificato, esso costituisce un valido sistema sperimentale per la caratterizzazione preliminare di meccanismi molecolari.

3. L'ambiente psoriasico

La psoriasi è una dermatosi infiammatoria cronica, sostenuta da predisposizione genetica (in particolare, in presenza dell'allele di rischio C*06:02) e da alcuni fattori ambientali (infezione da streptococco, stress, fumo, obesità, consumo di alcool), caratterizzata da una complessa interazione tra il sistema immunitario e le cellule della pelle. Colpisce circa il 2-3% della popolazione mondiale, con una prevalenza che varia significativamente tra le diverse regioni geografiche, raggiungendo picchi dell'11% nelle popolazioni caucasiche. La patologia si manifesta attraverso diverse varianti cliniche, tra cui la psoriasi guttata, inversa, eritrodermica e pustolosa (Figura 5). Tuttavia, la forma più diffusa è rappresentata dalla psoriasi a placche (o psoriasi volgare), la quale si presenta con placche eritematose e pruriginose dal tipico colore rosa salmone, nettamente delimitate e ricoperte da scaglie bianco-argentate. [20–22]

È una patologia cutanea complessa di lunga durata, spesso associata a malattie cardiovascolari, metaboliche, gastrointestinali. Pertanto, viene considerata una severa patologia sistemica multifattoriale piuttosto che esclusivamente una condizione dermatologica ed è riconosciuta come estremamente debilitante dal punto di vista psico-sociale, con conseguenti significativi risvolti socioeconomici per la salute pubblica [22,23].

Sebbene il tasso di mortalità sia basso, i pazienti che ne sono affetti sperimentano un significativo peggioramento della qualità di vita, dovuto ai sintomi, che comprendono dolore, prurito e sanguinamento, oltre alle comorbidità associate. [24]

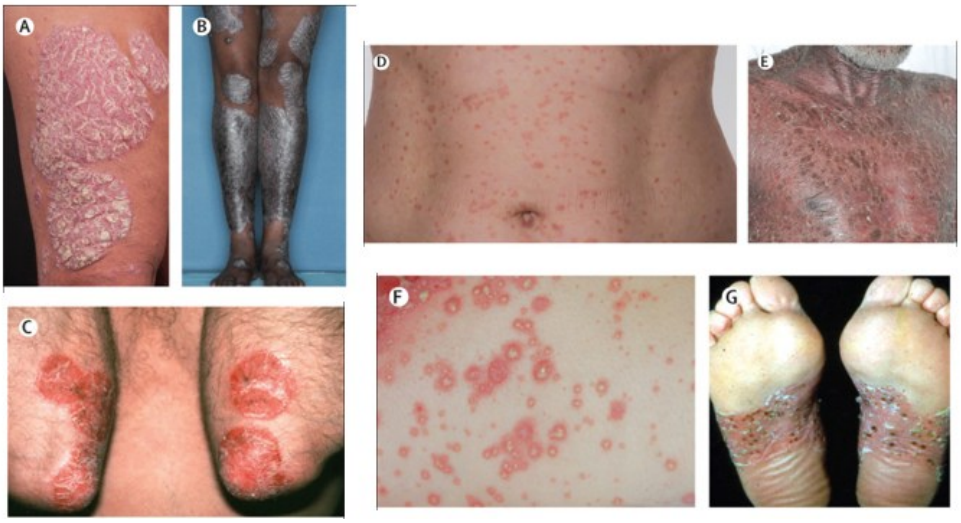


Figura 5: Manifestazioni cliniche della psoriasi: placca rosa su pelle chiara (A); placca grigia su pelle scura (B); lesioni in sede articolare (C); psoriasi guttata (D); psoriasi eritrodermica (E); psoriasi pustolosa (F); psoriasi a livello palmoplantare (G) [21]

3.1 Istopatologia: alterazione del differenziamento e disfunzione della barriera

Dal punto di vista istopatologico, la psoriasi è caratterizzata da un'iperproliferazione dei cheratinociti, che si traduce in un ispessimento patologico dell'epidermide (acantosi) e dello strato corneo (ipercheratosi) accompagnato dall'allungamento verso il basso delle creste interpapillari. In parallelo, si osserva una grave compromissione del programma di differenziamento terminale. [20,21,25] I cheratinociti vanno incontro ad una maturazione aberrante che determina la paracheratosi, ovvero la persistenza dei nuclei cellulari in alcuni corneociti. Il corretto assemblaggio dell'involucro corneo viene impedito, determinando la formazione di squame stratificate. Lo strato granuloso appare spesso ridotto o assente, i capillari allungati e dilatati. Inoltre, si osserva la presenza di un infiltrato infiammatorio di cellule T nel derma e nell'epidermide e talvolta gruppi di neutrofili e altre cellule dell'immunità. [20,21,25]

La disfunzione della barriera cutanea nella psoriasi deriva anche dall'indebolimento delle giunzioni occludenti *Tight Junctions (TJs)*. L'aspetto morfologico non è il solo a subire alterazioni: la disregolazione della barriera cutanea immunitaria gioca un ruolo sinergico e fondamentale nello sviluppo del fenotipo psoriasico (Figura 6). [25]

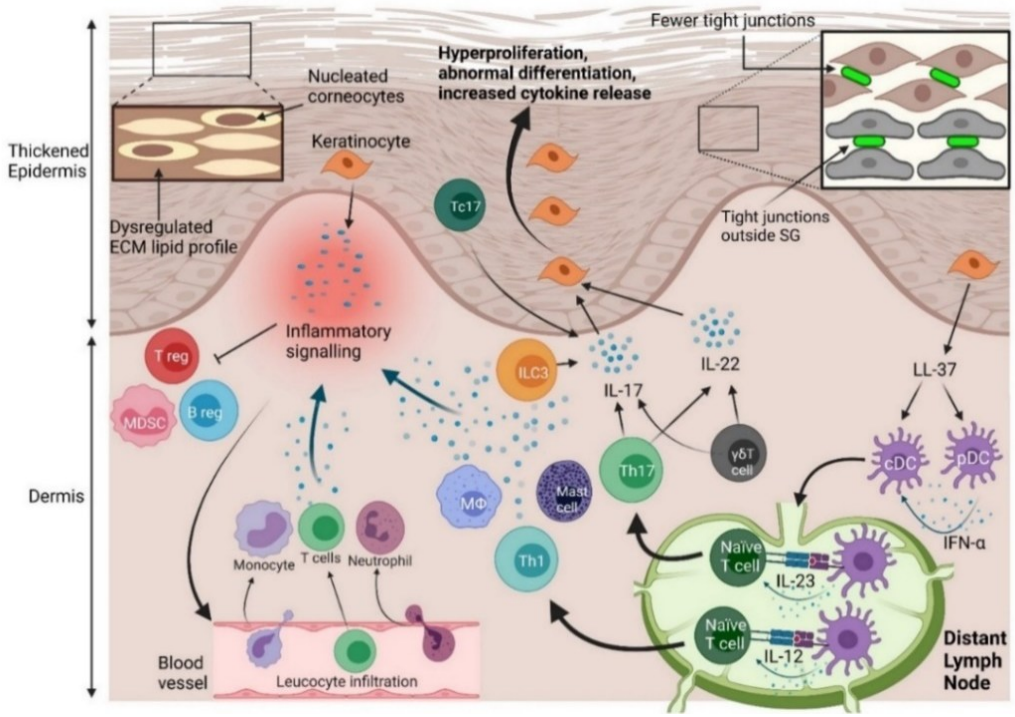


Figura 6: Disegno schematico dei meccanismi di distruzione della barriera fisica e immunitaria nella psoriasi [25]

3.2 Ambiente pro-infiammatorio

Alla base del processo patologico psoriasico vi è un'interazione tra il sistema immunitario innato e adattativo che genera una cosiddetta amplificazione *feed-forward* dell'infiammazione. Le cellule immunitarie innate rispondono rilasciando citochine proinfiammatorie quali Interleuchina (IL) IL-17, IL-22, IL-23, *Tumor Necrosis Factor-alfa* (TNF-α), Interferone-gamma (IFN-γ) e attivando una sostanziale risposta infiammatoria da parte del sistema immunitario adattativo, principalmente mediata dal rilascio di citochine, e che determina l'iperproliferazione cheratinocitaria. [21] In risposta, i cheratinociti producono autoantigeni e citochine, promuovendo e potenziando ulteriormente l'infiammazione in uno stato cronico. [25]

IL-23 è la citochina a monte nella patogenesi della psoriasi. In sede cutanea, insieme ad altre citochine quali IL-1β, TNF-α e IL-6, promuove la differenziazione delle cellule T native in linfociti T *helper* e T citotossici di tipo 17 (Th17 e Tc17) e li attiva per produrre IL-17. IL-17A agisce principalmente sui cheratinociti e, insieme a IL-22, ne accelera la proliferazione e induce il rilascio di vari mediatori infiammatori, chemochine (come CXCl8) e peptidi antimicrobici (come LL37, S100, β-defensine). [26,27]

L'attivazione dell'asse infiammatorio IL-23/IL-17A innesca un cosiddetto precoce "*psoriatic switch*" nell'epidermide. Molto prima che la lesione diventi clinicamente visibile o che si attivino i meccanismi di morte cellulare, l'azione sinergica di queste citochine provoca un rimodellamento strutturale delle *Tight Junctions* e alterazioni nel programma di differenziamento. [12,28]

Questo schema patogenetico, verificato dall'elevata efficacia clinica di farmaci biologici mirati anti-IL-17A, IL-23 e TNF-α, giustifica l'importanza di analizzare le fasi iniziali dello stimolo infiammatorio per comprendere la genesi del danno tissutale. [24]

3.3 Meccanismi di morte cellulare

Accanto ai processi di degradazione e disfunzione della barriera cutanea, l'epidermide psoriasica va incontro ad un'alterazione dei meccanismi fisiologici di sopravvivenza e morte cheratinocitaria. [29] Sebbene i cheratinociti psoriasici mostrino un'intrinseca resistenza all'apoptosi classica [30], risultano maggiormente suscettibili a forme di morte cellulare regolata di tipo infiammatorio, tra cui la necroptosi [31] e la ferroptosi [32]. La necroptosi scatena l'infiammazione psoriasica nei cheratinociti rilasciando *pattern* molecolari associati al danno (DAMPs) e attivando inflammasomi [31].

Con ferroptosi si intende una forma di morte programmata, non-apoptotica, dipendente dal ferro e caratterizzata da una letale perossidazione dei lipidi di membrana. [32]

Nel tessuto psoriasico, le citochine pro-infiammatorie promuovono l'accumulo di ferro e la riduzione del glutatione (GSH) e dell'enzima protettivo glutatione perossidasi 4 (GPX4), generando uno stress ossidativo che rende i cheratinociti vulnerabili alla lipoperossidazione. [6,29,33] Inoltre, l'innesco della ferroptosi stimola il rilascio di ulteriori citochine da parte delle cellule danneggiate, amplificando a sua volta la risposta immunitaria. [6,29]

4. Vescicole extracellulari (EVs)

Il rilascio di vescicole nello spazio extracellulare costituisce un processo biologico comune a pressoché tutti i tipi cellulari finora identificati, sia in condizioni fisiologiche sia patologiche. [34] Le vescicole extracellulari (EVs) sono una famiglia eterogenea di nanoparticelle endogene generate da diversi compartimenti subcellulari e rilasciate nello spazio extracellulare, potendo anche raggiungere la circolazione sistemica. [35] Sono strutture sferiche delimitate da un doppio strato fosfolipidico, di diametro compreso tra 30 nm e 2 μm, che gemmano dalla membrana cellulare. Pur essendo prive di nucleo e della capacità di replicarsi autonomamente, agiscono come mediatori nel dialogo biochimico intercellulare, trasportando informazioni bioattive capaci di influenzare le cellule riceventi. La loro ubiquità è testimoniata dal ritrovamento in una vasta gamma di biofluidi, tra cui sangue (plasma e siero), urine, saliva, latte materno, liquido sinoviale. [36,37]

4.1 Biogenesi e classificazione

Esistono diversi tipi di EVs in base alla loro origine cellulare, biogenesi e/o dimensione (Figura 7).

Gli *esosomi* sono la classe di dimensioni minori con un diametro generalmente compreso tra 50 e 150 nm e sono classificati come "*small* EVS" (sEVs). Si originano per via endocitica. La membrana degli endosomi precoci si introflette verso l'interno formando vescicole intraluminali che maturano in corpi multivescicolari (MVB), i quali si fondono con la membrana plasmatica causando il rilascio di esosomi nell'ambiente extracellulare.

Le *microvescicole (o ectosomi)* presentano misure comprese tra 100 e 1000 nm e sono classificate come EV di medie dimensioni. Diversamente dagli esosomi, vengono rilasciate per esocitosi, attraverso il gemmaggio esterno sito-specifico (*budding*) della membrana plasmatica, attraverso ridistribuzione dei fosfolipidi di membrana e fosforilazione della catena leggera della miosina, mediata dalla proteina Rho-chinasi, che facilita il distacco della vescicola.

I *corpi apoptotici* (ApoEV) costituiscono la frazione più grande, con dimensioni comprese tra 1 e 5 μm e si formano mediante *blebbing* della membrana plasmatica durante il processo apoptotico di morte programmata. A differenza delle altre popolazioni, possono contenere frammenti di organelli, cromatina e DNA nucleare. [38]

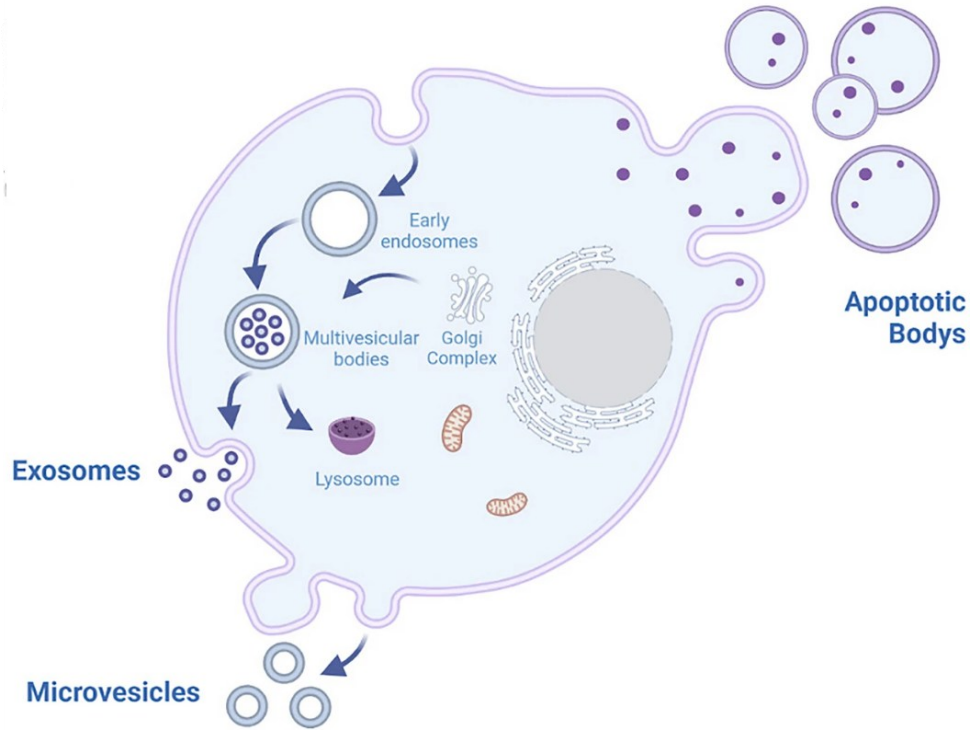


Figura 7: Rappresentazione schematica delle vie di biogenesi e rilascio delle principali popolazioni di vescicole extracellulari (EVs): esosomi, microvescicole e corpi apoptotici. [39]

Le EVs sono in grado di trasportare diversi materiali quali lipidi, proteine, acidi nucleici (DNA, mRNA, miRNA), glicani e molte combinazioni di queste molecole. La doppia membrana lipidica agisce per proteggere questo contenuto nel tragitto verso il bersaglio cellulare e la trasmissione di informazioni ad altre cellule può avvenire in modo paracrino o endocrino, benché il meccanismo regolatorio di smistamento alle cellule bersaglio resti al momento ancora sconosciuto. [40] Tuttavia, è noto che una volta rilasciate nello spazio extracellulare, le EVs possono essere assorbite dalle cellule riceventi tramite l'attivazione di recettori di superficie e conseguente internalizzazione delle vescicole via endocitosi (clatrina-mediata o macropinocitosi), per trasferire le informazioni biologiche contenute al loro interno. [36]

4.2 EVs nel *cross-talk* psoriasico

Le vescicole extracellulari svolgono un ruolo importante nella comunicazione cellula-cellula tra i cheratinociti stessi e tra loro e le cellule del sistema immunitario. Vengono rilasciate da varie popolazioni cellulari, tra cui cheratinociti, macrofagi, fibroblasti e cellule dendritiche, risultando parte integrante e attiva nella patogenesi della psoriasi (Figura 8). Il loro coinvolgimento è stato reso noto anche grazie al modello di cellule HaCaT *in vitro*, anch'esse in grado di rilasciare EVs. [38]

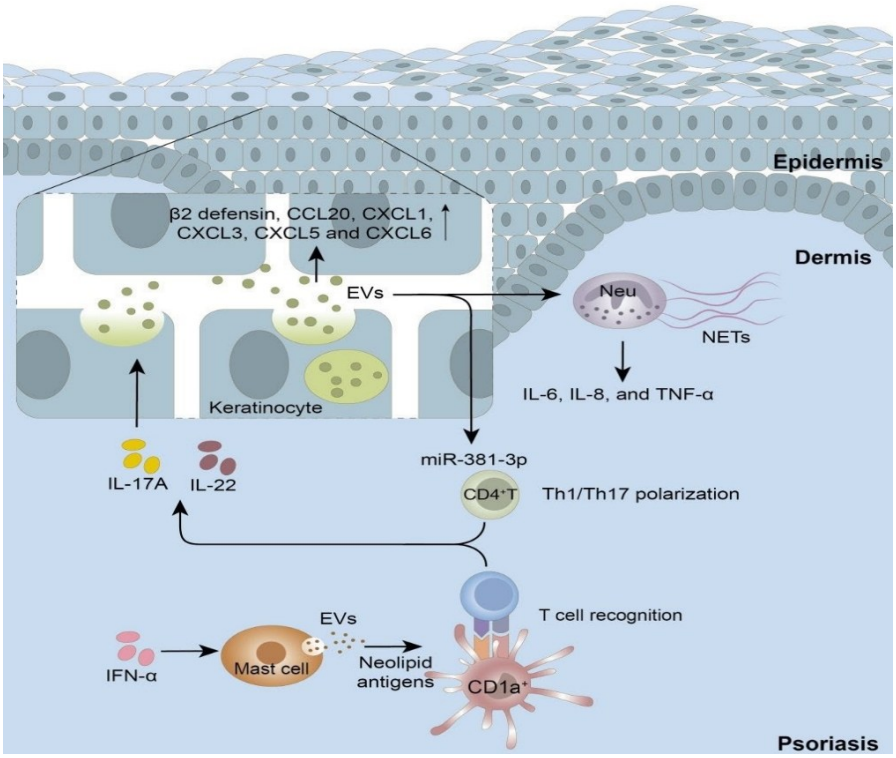


Figura 8: Ruolo delle vescicole extracellulari (EVs) nella comunicazione intercellulare della cute psoriasica e nella modulazione dei meccanismi patogenetici associati alla progressione della malattia [36]

L'esposizione ad uno stimolo citochimico psoriasico, composto da alcune citochine chiave, tra cui IL-17A, IL-22, IL-23, TNF-α, è in grado di alterare ed influenzare il rilascio di vescicole extracellulari in termini sia quantitativi sia di contenuto. In particolare, IL-17A gioca un ruolo centrale nella generazione di EVs, stimolando la secrezione di vescicole contenenti segnali di pericolo (DAMPs) e mediatori flogistici. Tra questi, i più rilevanti sono i peptidi antimicrobici, come la β-defensina 2 umana (hBD2) e la proteina S100A12, la cui espressione all'interno delle EVs risulta correlata alla gravità della patologia, secondo l'indice PASI (*Psoriasis Area Severity Index*). [35,36] Le EVs rilasciate dai cheratinociti psoriasici raggiungono i cheratinociti sani adiacenti, propagando lo stato infiammatorio lungo la barriera epidermica e accelerando la perdita di integrità del tessuto. [41] Inoltre, le vescicole vengono internalizzate dai neutrofili, inducendo la formazione di trappole extracellulari (NETosis) che alimentano ulteriormente la flogosi. Contemporaneaamente, influenzano la polarizzazione dei linfociti T verso i fenotipi Th1 e Th17, attraverso il trasferimento di specifici microRNA, come il miR-381-3p, che amplifica la produzione di citochine pro-infiammatorie, soprattutto IL-17A. [34,36] Infine, le vescicole extracellulari entrano nella circolazione sistemica raggiungendo siti distanti e agendo da potenti amplificatori del danno, contribuendo alla natura sistemica della psoriasi e allo sviluppo delle sue numerose comorbidità.

5. Approcci anti-infiammatori protettivi di sostanze biogene

L'utilizzo di sostanze naturali per modulare i processi infiammatori e lo stress ossidativo rappresenta un'importante frontiera di ricerca. Tra questi composti, il genere *Curcuma* è noto per le sue proprietà nutraceutiche e cosmoceutiche, ampiamente analizzate. [42] Di recente gli studi si stanno spostando su varietà botaniche meno comuni che presentano caratteristiche potenzialmente determinanti per la protezione della barriera cutanea.

5.1 Proprietà biologiche della Curcuma

La curcuma tradizionale (*Curcuma longa*) è una pianta dal tipico colore giallo, utilizzata come spezia nel mondo culinario, e che ha suscitato grande interesse in ambito medico e scientifico (Figura 9). Si tratta di una pianta erbacea perenne rizomatosa appartenente alla famiglia dello zenzero. È una fonte di curcumina, le cui proprietà medicinali sono note da migliaia di anni; tuttavia, i suoi componenti bioattivi sono stati studiati solo di recente. La curcumina (1,7-bis(4-idrossi-3-metossifenil)-1,6-eptadiene-3,5-dione), o diferuloilmetano, è il principale polifenolo naturale presente nel rizoma della *Curcuma longa* e da secoli è stata tradizionalmente utilizzata nei paesi asiatici come erba medicinale per le sue proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, antimutagene, antimicrobiche e anticancerogene. [42]

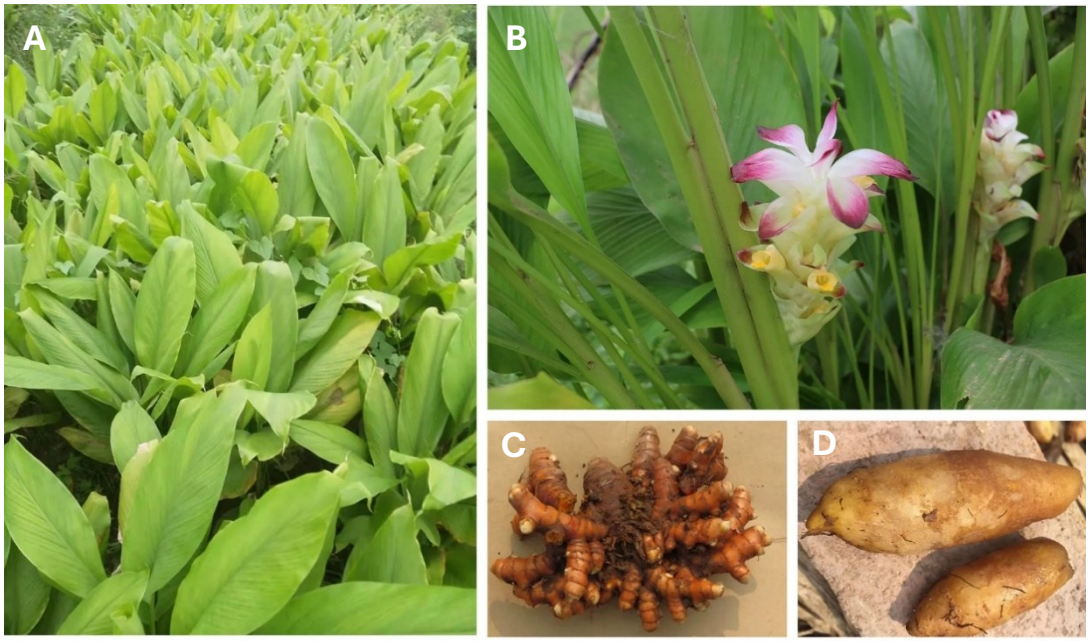


Figura 9: *Caratteristiche morfologiche di C. longa. (A) Pianta; (B) infiorescenza; (C) rizomi; (D) tuberi* [43]

È stato dimostrato che questa sostanza è coinvolta nella regolazione dei processi infiammatori di diverse malattie croniche, tra cui quelle neurodegenerative, cardiovascolari, polmonari, metaboliche, ed autoimmuni (tra cui la psoriasi). A livello molecolare, la curcumina è in grado di interagire con molteplici *target* cellulari. In particolare, essa agisce come inibitore del fattore di trascrizione NF-κB, la cui attivazione viene aumentata da diversi stimoli infiammatori. In questo modo, blocca a monte la produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 e TNF-α, mediatori della patogenesi psoriasica. [44]

Lo stress ossidativo, derivato dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS e RNS, rispettivamente), ha un ruolo cruciale nell'innescare e sostenere le risposte infiammatorie. Un eccesso di ROS/RNS può attivare vari fattori di trascrizione coinvolti nell'infiammazione, esacerbandola. La curcumina aiuta a ridurre lo stress ossidativo abbassando la produzione delle specie reattive agendo sulla NADPH ossidasi (NOX) e potenziando l'attività di enzimi antiossidanti, quali glutatione perossidasi (GSH), catalasi e superossido dismutasi (SOD), coinvolti nella neutralizzazione dei radicali liberi. Diminuendo i livelli di ROS/RNS e migliorando la capacità antiossidante, essa promuove la salute cellulare generale. [44]

5.2 Varietà del genere Curcuma

Il genere *Curcuma (Zingiberaceae)* rappresenta un gruppo di erbe rizomatose perenni originarie delle regioni tropicali/subtropicali, ampiamente coltivate in Asia, Australia e Sud America. Esistono circa 93-100 specie riconosciute, che differiscono nelle caratteristiche morfologiche del rizoma e della spiga, e soprattutto nel rapporto variabile tra i curcuminoidi (curcumina, dimetossicurcumina, bisdimetossicurcumina), la frazione polifenolica non volatile, e gli oli essenziali, la frazione volatile ricca di sesquiterpenoidi e monoterpenoidi. Specie meno comuni, come *C. aromatica*, *C. zedoaria* o *C. aeruginosa* presentano molecole volatili quali canfora, curcumenolo e germacrone, che conferiscono proprietà analgesiche e antibatteriche. [45]

Questa grande varietà sottolinea l'opportunità della ricerca di estendersi oltre la curcumina tradizionale allo scopo di identificare nuovi composti capaci di agire sinergicamente nella protezione del tessuto epiteliale nel contesto di stimoli patologici complessi.

5.3 *Curcuma caesia* Roxb. (curcuma blu)

La *Curcuma caesia Roxb.*, originaria dell'India nord-orientale, è conosciuta come curcuma nera o blu a causa della tipica colorazione nerastra-bluastra del suo rizoma e rappresenta una risorsa emergente in ambito scientifico (Figura 10). Diversamente dalla curcuma tradizionale, la *C. caesia* presenta un contenuto molto basso di curcuminoidi e risulta particolarmente ricca in composti fenolici (pigmenti antociani, flavonoidi) e sesquiterpeni. [46] Analisi chimiche avanzate condotte sul fitocomplesso (CCRE) estratto dal rizoma di *Curcuma caesia* hanno identificato alte concentrazioni di composti fenolici, quali (-)-epicatechina, procianidina B2 e acido p-cumarico, e la frazione volatile presenta molecole di curcumenolo, curzerenone e germacrone. [47,48]

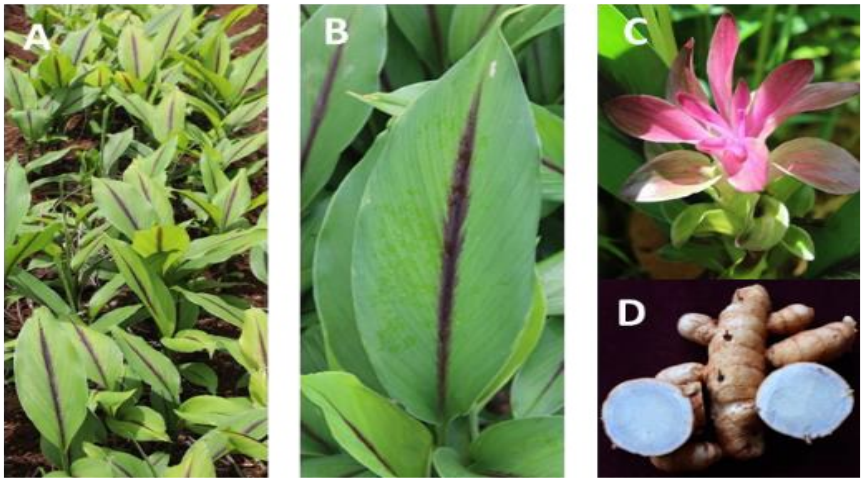


Figura 10: Caratteristiche morfologiche di C. caesia. (A) Pianta; (B) foglia; (C) infiorescenza; (D) rizoma [46]

Per valutare l'effetto biologico di questa specifica composizione fitochimica, sono stati condotti studi su modelli cellulari di cheratinociti umani (HaCaT) che hanno dimostrato che l'estratto di curcuma blu esercita un effetto protettivo contro insulti ambientali, come l'esposizione a raggi ultravioletti (UVB) e stati infiammatori. [48] Il trattamento con CCRE riduce in maniera significativa i livelli di anione superossido mitocondriale, indicando una maggiore resilienza cellulare allo stress ossidativo. Inoltre, riduce l'espressione di IL-6 e TNF-α indotta da UVB e la fosforilazione di IKK, impedendo l'attivazione patologica di NF-κB, che svolge un ruolo cruciale nell'infiammazione legata all'invecchiamento. Nel complesso, la composizione chimica e gli effetti biologici del CCRE lo rendono un potenziale ingrediente per formulazioni e alimenti funzionali per contrastare i segni dell'invecchiamento cutaneo e migliorare la salute generale della pelle, contribuendo a mantenere l'omeostasi cellulare e attenuando le risposte infiammatorie. [48]

STATO DELL'ARTE

L'epidermide, ovvero lo strato più superficiale della cute rappresentato da tessuto epiteliale, ricopre quasi tutta la superficie corporea e costituisce la prima linea di difesa dell'organismo. Si compone di una popolazione cellulare eterogenea, il cui citotipo prevalente è rappresentato da cellule epiteliali, i cheratinociti. Queste cellule instaurano tra loro una complessa rete di giunzioni intercellulari, comprendente giunzioni occludenti (*Tight Junctions*, TJ), giunzioni comunicanti (*Gap Junctions*), giunzioni aderenti e desmosomi, che contribuiscono al mantenimento dell'istoarchitettura e della funzionalità del tessuto. [49]

L'integrità di tale rete di giunzioni è fondamentale per il mantenimento della barriera epidermica, ma viene compromessa durante i processi infiammatori che caratterizzano diverse patologie cutanee, tra cui la dermatite atopica e la psoriasi. Quest'ultima, colpendo il 2-3% circa della popolazione mondiale, rappresenta una delle più comuni malattie infiammatorie associate ad un'alterata funzionalità della barriera epidermica. [24] Sebbene il tasso di mortalità sia basso, i pazienti con psoriasi sperimentano una significativa compromissione della qualità della vita, sia per la presenza di comorbidità, sia per l'enorme carico psicosociale, dovuto alla manifestazione di placche cornee cutanee differenti in base alla tipologia psoriasica. [24]

La sua patogenesi è complessa e coinvolge una stretta interazione tra cheratinociti, cellule immunitarie infiltrate e altre popolazioni cellulari residenti nella cute. [50] Per lungo tempo considerata una patologia epidermica esclusivamente iperproliferativa, la psoriasi è oggi riconosciuta come una malattia immunomediata, nella quale l'attivazione dei linfociti T-helper Th1 e Th17/22, e la conseguente produzione di citochine quali TNFα, IL-23 [51–53] e IL-17A, IL-22 [54] svolgono un ruolo centrale. I cheratinociti, a loro volta, rispondono a questi segnali citochimici, orchestrando risposte immunitarie innate e adattative e contribuendo all'attivazione e al mantenimento della risposta infiammatoria. [50,55]

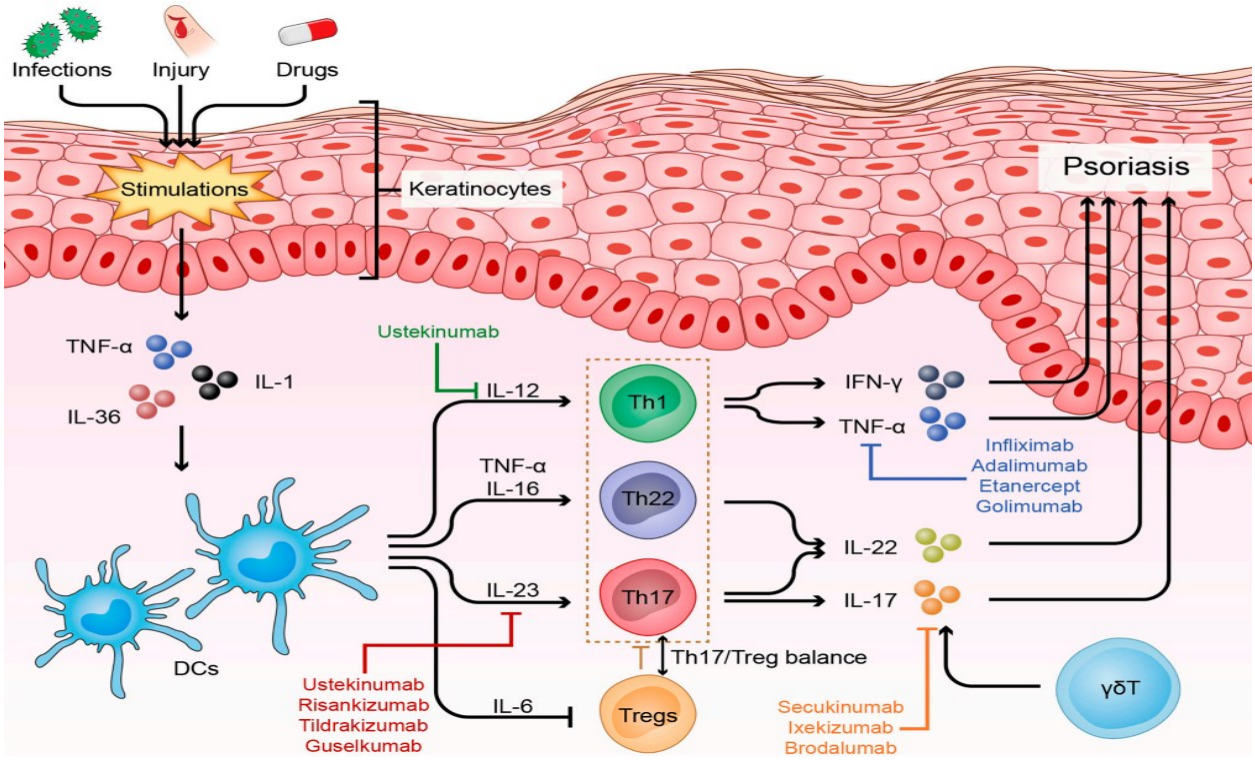


Figura 11: Rappresentazione schematica dei principali pathways molecolari alla base della patogenesi della psoriasi e dei principali targets farmacologici impiegati nelle terapie biologiche. [55]

La complessità della rete di interazioni cellulari e molecolari alla base della psoriasi ha reso necessario lo sviluppo di modelli sperimentali *in vitro* in grado di riprodurre, almeno in parte, le alterazioni caratteristiche del microambiente psoriasico. Inizialmente l'attenzione è stata concentrata prevalentemente sull'effetto di singoli mediatori pro-infiammatori; tuttavia, evidenze più recenti hanno dimostrato come lo stimolo indotto da singole citochine non sia sufficiente a riprodurre la complessità delle alterazioni fenotipiche osservate *in vivo*. [56] I lavori di Rabeony *et al.* [57] e successivamente di Bochénska *et al.* [58] hanno evidenziato come l'impiego di combinazioni sinergiche di citochine pro-infiammatorie (miscele o MIX citochimici) consenta di replicare un fenotipo simil-psoriasico.

In questo contesto, si inseriscono gli studi condotti dal gruppo di lavoro della Prof.ssa Donetti dell'Università degli Studi di Milano e della Prof.ssa Riva dell'Università degli Studi di Pavia (con cui ho svolto il mio internato di tesi), utilizzando modelli tridimensionali (3D) di cute umana sana *ex vivo* e colture primarie di cheratinociti [19]

Questi studi hanno evidenziato come la stimolazione combinata con le citochine proinfiammatorie coinvolte nella psoriasi, in particolare IL-17A, IL-22, IL-23 e TNFα, sia in grado di alterare la barriera fisica già dopo 24-48 ore di esposizione, sottolineando il ruolo di questi mediatori nella regolazione dei processi differenziativi e proliferativi dei cheratinociti già nelle fasi precoci della patologia psoriasica. [18,59–62]

Sebbene i modelli cutanei tridimensionali (3D) ed *ex vivo* consentano di riprodurre con elevata fedeltà la complessità e l'architettura del tessuto cutaneo, il loro impiego può essere condizionato dalla variabilità interindividuale associata ai donatori. Per alcune applicazioni sperimentali risulta pertanto vantaggioso utilizzare modelli *in vitro* più semplici e standardizzati, che permettano di studiare specifici meccanismi cellulari in condizioni controllate. Tra i modelli bidimensionali (2D), i cheratinociti umani primari (NHKs) rappresentano il sistema fisiologicamente più prossimo alla condizione *in vivo,* per quanto il loro impiego sperimentale sia limitato da una breve emivita in coltura e da una marcata variabilità inter-donatore. La linea cellulare HaCaT, costituita da cheratinociti umani immortalizzati, offre un sistema maggiormente standardizzato e riproducibile, ampiamente utilizzato in studi biologici relativi alla cute. Le cellule HaCaT sono geneticamente stabili e capaci di mantenere un programma di differenziamento terminale pressoché completo sovrapponibile a quello fisiologico, che permette di monitorare l'integrità delle *Tight Junctions (i.e*. Claudina 1 (CLDN-1) e *Zonula Occludens* 1 (ZO-1)) e studiare separatamente i meccanismi molecolari dello "*psoriatic switch*". [13–16]

Tuttavia, in condizioni *standard* di coltura, i cheratinociti HaCaT non esprimono spontaneamente il corredo proteico tipico della barriera cutanea matura, mantenendo prevalentemente un fenotipo basale, caratterizzato da elevati livelli di cheratina K14 e da una limitata espressione di *markers* terminali quali cheratina K10, involucrina e filaggrina. [15] Pertanto, per ottenere *in vitro* un fenotipo maggiormente differenziato, è necessario fornire stimoli esogeni in grado di riprodurre i segnali fisiologici presenti *in vivo*. Nell'epidermide umana la concentrazione extracellulare dello ione calcio (Ca^{2+}), uno degli agenti regolatori più rilevanti, segue un gradiente ben definito, caratterizzato da valori più bassi nello strato basale che aumentano progressivamente verso lo strato granuloso. Questa variazione costituisce un segnale critico per indurre i cheratinociti a uscire dal programma proliferativo del ciclo cellulare e a intraprendere il processo di differenziamento terminale. [13,15]

In vitro, questo aspetto viene replicato attraverso il metodo del "*calcium switch*", che consiste nel passaggio dei cheratinociti da un terreno a bassa concentrazione di calcio, generalmente inferiore a 0.1 mM) ad uno contenente concentrazioni più elevate, tipicamente superiori a 1.2 mM, con protocolli che raggiungono valori di 1.8-2.8 mM, in base allo stadio differenziativo che si vuole mimare. [13,15,16] Le cellule HaCaT rispondono costruendo solide giunzioni intercellulari e inducendo la trascrizione e la traduzione di K10 e involucrina, la cui presenza indica un fenotipo più differenziato. [13,15,16]

Accanto alla concentrazione di calcio, la confluenza delle cellule in coltura gioca un ruolo fondamentale nel determinare il destino cellulare. Le evidenze sperimentali suggeriscono che le cellule HaCaT comincino ad esprimere *markers* di differenziamento quando superano una densità critica, generalmente stimata oltre l'80-85% di confluenza, anche in presenza di bassi livelli di calcio. [13,63]

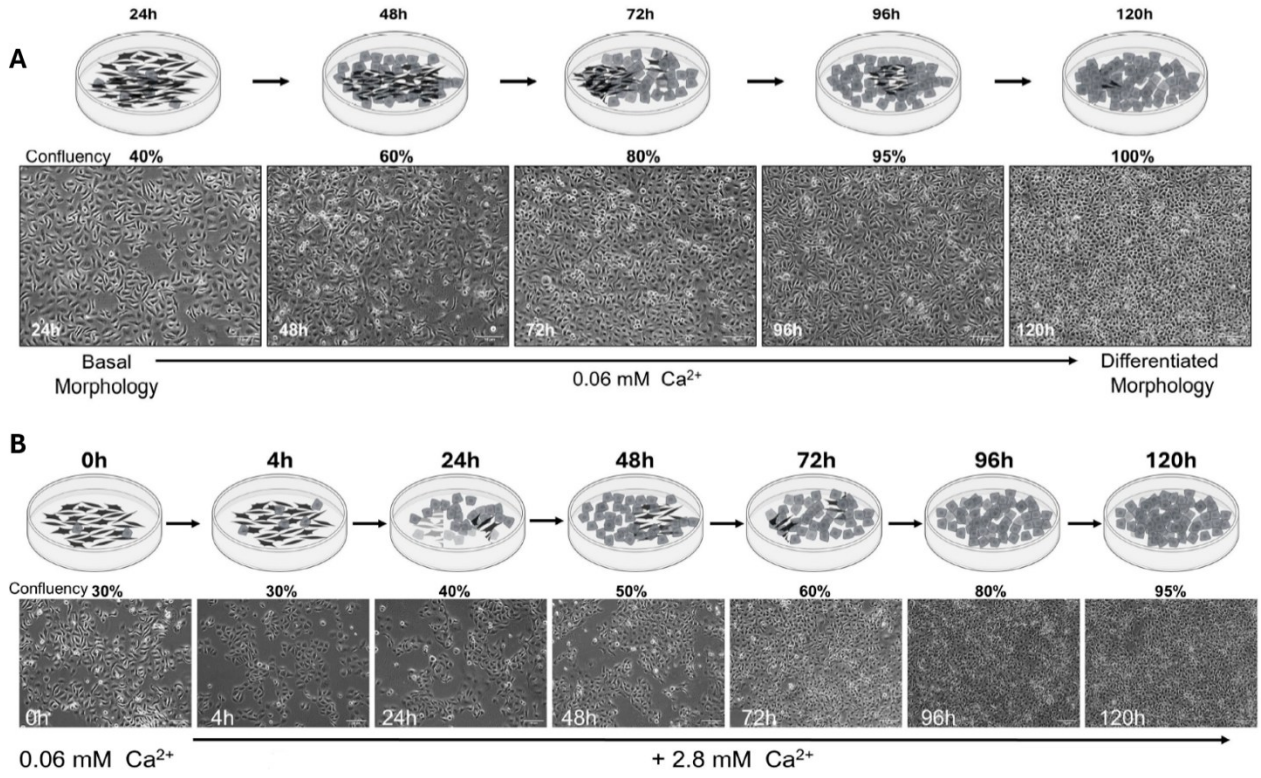


Figura 12: Effetti della concentrazione extracellulare di calcio e della confluenza sulla morfologia e sul differenziamento delle cellule HaCaT. (A) Cellule HaCaT coltivate in condizioni di bassa concentrazione di calcio (0.06 Ca^{2+}). (B) Cellule HaCaT inizialmente coltivate in condizioni di bassi livelli di calcio e successivamente esposte ad un'elevata concentrazione di calcio (2.8 mM Ca^{2+}). Sono riportate immagini rappresentative acquisite mediante microscopia a contrasto di fase ai time points indicati. [63]

L'induzione del differenziamento mediante aumento della concentrazione extracellulare di calcio consente di ottenere un modello HaCaT più rappresentativo dello stato differenziato dei cheratinociti epidermici, utile per lo studio delle alterazioni indotte da condizioni infiammatorie e patologiche. In questo quadro si inserisce il recente contributo di Riva *et al.* che ha caratterizzato la risposta delle cellule HaCaT differenziate a un microambiente psoriasico riprodotto mediante una combinazione sinergica di un *pool* di citochine infiammatorie (IL-17A, IL-22, IL-23 e TNFα) [6].

Lo studio ha dimostrato come lo stimolo citochimico induca precoci alterazioni morfologiche e funzionali, con particolare riferimento all'organizzazione delle *Tight Junctions*. In particolare, è stata osservata una riduzione dell'espressione di CLDN-1 e una distribuzione disomogenea di ZO-1, due marcatori fondamentali dell'integrità della barriera epidermica. Inoltre, lo studio ha descritto il fenomeno della ferroptosi, una forma di morte cellulare programmata, dipendente dal ferro e caratterizzata da perossidazione lipidica, come possibile meccanismo coinvolto nel danno indotto dalle citochine psoriasiche nelle cellule HaCaT. [6]

Le alterazioni indotte dal microambiente psoriasico non riguardano esclusivamente le singole cellule, ma si inseriscono in una complessa rete di comunicazione intercellulare. Infatti, i cheratinociti non agiscono isolatamente, ma comunicano tra loro, e con le altre popolazioni cellulari presenti nell'epidermide, comprese le cellule immunitarie, contribuendo sia al mantenimento dell'omeostasi cutanea sia alla regolazione dei processi infiammatori psoriasici, in cui è ormai affermato e noto in letteratura il coinvolgimento delle vescicole extracellulari (EVs). [35,64] Le EVs, inizialmente considerate semplici prodotti di scarto cellulare, sono oggi riconosciute come importanti mediatori della comunicazione intercellulare, capaci di veicolare molecole bioattive e influenzare il comportamento delle cellule riceventi, sia a livello locale sia a distanza. [65]

Il rilascio e la composizione di queste vescicole possono essere modulati dall'ambiente citochimico. Nel lavoro di Mangino *et al.* è stato osservato che la stimolazione delle cellule HaCaT con IL-17A, citochina chiave nella patogenesi psoriasica, sembra ridurre in termini quantitativi il rilascio di EVs e ne modifica il contenuto molecolare. Le vescicole rilasciate in queste condizioni risultano infatti arricchite di mRNA codificanti per mediatori pro-infiammatori e peptidi antimicrobici (AMPs). [66]

In parallelo, Capriotti *et al.* ha evidenziato che la stimolazione sinergica con IL-17A, TNFα e IL-22 determina la presenza, all'interno delle vescicole, di molecole particolarmente rilevanti per la risposta infiammatoria, tra cui l'mRNA codificante per la β-defensina 2 (hBD2) e la proteina S100A12. [35]

Oltre a essere modificate dal contesto infiammatorio, le EVs possono a loro volta contribuire alla propagazione del segnale flogistico attraverso il trasferimento del loro contenuto. A questo proposito, il gruppo di Jiang *et al.* ha dimostrato che le EVs psoriasiche possono attivare i neutrofili, inducendo la formazione di NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) attraverso l'attivazione dei *pathway* di NF-κB e p38 MAPK nelle cellule riceventi. [67]

Lo studio ha inoltre evidenziato un aumento dei livelli di miR-381-3p nelle EVs provenienti da pazienti psoriasici, la cui espressione correla positivamente con la gravità clinica della malattia, valutata tramite il punteggio PASI (*Psoriasis Area Severity Index*), un indice numerico per la misurazione della gravità e dell'estensione della malattia. Questo specifico miRNA, una volta trasferito alle cellule riceventi attraverso le vescicole, è in grado di inibire *targets* come l'ubiquitin-ligasi UBR5, regolatore dell'espressione proteica e il fattore di trascrizione anti-infiammatorio FOXO1, favorendo la polarizzazione delle cellule T verso il fenotipo Th17, alimentando così il circolo vizioso della patologia. [64]

Nel complesso, queste evidenze indicano che le vescicole extracellulari possono essere modulate dal microambiente psoriasico e, a loro volta, contribuire alla propagazione della risposta infiammatoria. Tuttavia, sebbene sia noto che le citochine pro-infiammatorie alterino la barriera [6], rimane ancora da chiarire se le EVs rilasciate dai cheratinociti in condizioni psoriasiche possano contribuire direttamente a tali alterazioni, influenzando l'espressione dei marcatori di differenziamento e l'organizzazione delle proteine costituenti le *Tight Junctions*, quali CLDN-1 e ZO-1.

Parallelamente allo studio dei meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nella patogenesi della psoriasi, un crescente interesse è rivolto all'identificazione di strategie in grado di contrastare le alterazioni indotte dal microambiente psoriasico. In questo ambito, i composti di origine naturale rappresentano una promettente frontiera di ricerca, grazie alla presenza di molecole dotate di proprietà antinfiammatorie e antiossidanti. Tra queste, particolare attenzione è stata rivolta alla curcumina, il principale polifenolo bioattivo estratto dalla specie classica *Curcuma Longa,* ampiamente studiata per i suoi potenziali effetti nella modulazione dei processi infiammatori cutanei.

Le evidenze sperimentali disponibili suggeriscono un potenziale effetto della curcumina nel contrastare alcune delle alterazioni caratteristiche del fenotipo psoriasico. In uno studio condotto su cellule HaCaT, Zhao *et al.* hanno dimostrato come la curcumina sia in grado di contrastare l'iperproliferazione dei cheratinociti indotta dall'IL-22, citochina chiave dell'asse Th17 che promuove l'acantosi attivando la via di segnalazione di STAT3. Il polifenolo riduce notevolmente la fosforilazione di STAT3, e di conseguenza down-regola l'espressione proteica di ciclina D1 e ciclina E, arrestando il ciclo cellulare dei cheratinociti psoriasici. [68]

A questi risultati si aggiungono i dati di Varma *et al.* ottenuti in un modello di HaCaT differenziate e stimolate con imiquimod (IMQ). In questo contesto, il trattamento con curcumina riduce i livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-17, TNF-α, IL-6 e IFN-γ) e induce un aumento dell'espressione genica e proteica di filaggrina e involucrina, suggerendo che la curcumina possa contribuire non solo alla modulazione della risposta infiammatoria, ma anche al ripristino del programma di differenziamento terminale alterato dal microambiente psoriasico. [69] Il potenziale della curcumina è stato valutato anche in studi clinici, dai quali è emerso che l'integrazione della curcumina in alcuni protocolli terapeutici convenzionali, in combinazione con farmaci sistemici come l'acitretina o corticosteroidi, è stata associata ad un miglioramento nella risoluzione delle placche psoriasiche, che si riflette nella riduzione del punteggio PASI e tassi di risposta superiori rispetto alle singole terapie *standard*. Coerentemente, studi condotti in modelli preclinici *in vivo* di dermatite simil-psoriasica hanno mostrato una riduzione dello spessore cutaneo e della desquamazione, insieme alla diminuzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie quali IL-17, IL-22, e TNFα. [70]

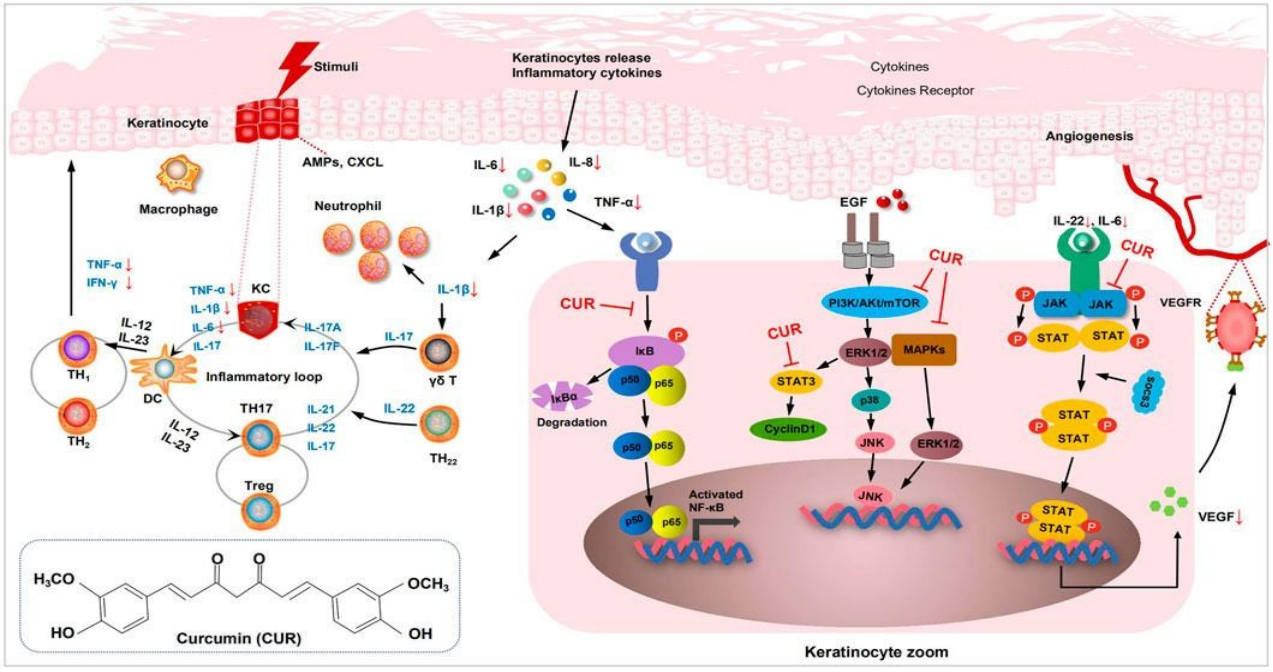


Figura 13: Rappresentazione schematica dei possibili meccanismi d'azione della curcumina (CUR) nella psoriasi. [70]

Nonostante i risultati promettenti, l'applicazione terapeutica della curcumina classica è limitata dalla sua ridotta biodisponibilità sistemica, in particolare dopo somministrazione orale. Sebbene il composto sia generalmente ben tollerato, il ridotto assorbimento e la rapida degradazione della sostanza nel fegato dopo l'ingestione possono limitarne l'efficacia a lungo termine. [70]

Questa criticità farmacocinetica ha stimolato lo sviluppo di formulazioni topiche alternative e di sistemi di veicolazione avanzati, volti a migliorarne la disponibilità. Parallelamente, l'interesse è stato rivolto anche verso specie botaniche appartenenti al genere *Curcuma* caratterizzate da fitocomplessi differenti, tra cui la *Curcuma caesia Roxb*, comunemente nota come "curcuma blu".

La *C. caesia* si distingue dalla *C. Longa* per la diversa composizione del proprio fitocomplesso, che comprende numerosi composti fenolici e altre molecole bioattive. Analisi condotte mediante HPLC-ESI-MS/MS dal gruppo di Burattini *et al.*, hanno evidenziato, tra i componenti, un'elevata concentrazione di composti fenolici rari come l'epicatechina, la procianidina B2 e l'acido ellagico. A livello funzionale, l'estratto di curcuma blu (CCRE) ha mostrato la capacità di modulare la risposta allo stress infiammatorio e ossidativo, agendo a monte sull'attivazione del *pathway* di NF-κB, attraverso l'inibizione della fosforilazione di IKK, e riducendo significativamente i livelli di anione superossido mitocondriale. [48]

Nel complesso, gli studi hanno dimostrato che la curcumina può modulare processi quali proliferazione, infiammazione e differenziamento dei cheratinociti; indagini preliminari su *C. caesia* hanno osservato la sua capacità di agire contrastando lo stress ossidativo e il danno mediato dal microambiente infiammatorio. [48,69]

In conclusione, nonostante i progressi nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della psoriasi, rimangono alcuni aspetti da approfondire. Per quanto risulti ormai ampiamente riconosciuto dalla comunità scientifica il ruolo delle vescicole extracellulari, rimane ancora da indagare il loro ruolo diretto nell'alterazione della barriera epidermica e dei processi di differenziamento dei cheratinociti. In parallelo, la ricerca di strategie in grado di contrastare le alterazioni associate all'infiammazione cutanea ha portato a un crescente interesse verso composti di origine naturale. Tra questi, la *Curcuma caesia Roxb.* potrebbe rappresentare un candidato di interesse per le sue proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, sebbene le evidenze disponibili nel contesto psoriasico siano ancora limitate.

In questo scenario, si inserisce il presente lavoro di tesi che, utilizzando un modello di cellule HaCaT differenziate in cui viene ricreato un microambiente pro-infiammatorio psoriasico, si propone di indagare il ruolo attivo delle vescicole extracellulari nella progressione della patologia e, in parallelo, di esaminare il potenziale protettivo del fitocomplesso di *C. caesia*, attraverso la valutazione della proliferazione cellulare, dei marcatori di differenziamento epidermico e dell'integrità dei complessi giunzionali.

SCOPO DEL LAVORO

La ricerca sulla patogenesi della psoriasi si è focalizzata prevalentemente sulle alterazioni cellulari caratteristiche della placca cutanea conclamata, caratterizzata da una marcata iperproliferazione cheratinocitaria e da un differenziamento terminale alterato. Diversamente, i meccanismi cellulari e giunzionali che si instaurano nelle fasi iniziali della patologia, prima della comparsa clinica della lesione, risultano ancora non completamente chiariti. In questo contesto, risulta particolarmente interessante caratterizzare le alterazioni epidermiche precoci indotte dall'ambiente infiammatorio.

Il presente lavoro di tesi ha previsto l'impiego di un modello bidimensionale *in vitro* di cheratinociti umani spontaneamente trasformati (cellule HaCaT), indotti al differenziamento, nel quale il microambiente pro-infiammatorio associato alla psoriasi è stato riprodotto mediante l'esposizione ad una miscela composta da quattro delle principali citochine coinvolte nella patologia: IL-17A, IL-22, IL-23 e TNF-α. Il modello è stato utilizzato per valutare gli effetti biologici della stimolazione citochimica sulla proliferazione cellulare, sull'organizzazione della barriera, mediante l'analisi delle proteine Claudina-1 e ZO-1 (costituenti le *Tight Junctions*) e sul differenziamento epidermico, attraverso *marker* come la cheratina 10 (K10) associata agli strati soprabasali e più differenziati dell'epidermide.

Lo studio è stato condotto sviluppando parallelamente due principali linee sperimentali: la prima è stata focalizzata sulle vescicole extracellulari (EVs) e sul loro possibile coinvolgimento nella comunicazione paracrina del danno da psoriasi. In particolare, le EVs rilasciate dai cheratinociti esposti allo stimolo citochimico sono state isolate e successivamente somministrate a cheratinociti non stimolati, allo scopo di valutare la capacità di trasferire le alterazioni indotte dal microambiente infiammatorio, attraverso l'analisi degli effetti cellulari indotti. La seconda linea di indagine ha riguardato la valutazione di una possibile strategia terapeutica mediante l'impiego dell'estratto bioattivo di *Curcuma caesia Roxb.* (curcuma blu) sul modello *in vitro* di cheratinociti differenziati. Il trattamento è stato effettuato sulle cellule HaCaT differenziate stimolate con la miscela citochinica, al fine di determinare la capacità di contrastare le alterazioni indotte dall'ambiente psoriasico e di favorire il mantenimento delle caratteristiche fisiologiche dell'epitelio, in termini di proliferazione e differenziamento. Lo studio è stato incentrato sull'analisi degli effetti biologici indotti precocemente nei cheratinociti epidermici dall'azione infiammatoria delle citochine psoriasiche e sulla valutazione del possibile ruolo delle vescicole extracellulari nella propagazione del danno cellulare. In parallelo, è stato avviato un *set* sperimentale esplorativo per sondare il potenziale del composto naturale *Curcuma caesia Roxb.* come possibile strategia preventiva e/o terapeutica allo stato infiammatorio associato alla genesi e sviluppo della patologia psoriasica.

MATERIALI E METODI

Per lo svolgimento del presente lavoro di tesi sperimentale sono state utilizzate cellule HaCaT (CLS Cell Line Service GmbH, Eppelheim, Germania), una linea cellulare immortalizzata di cheratinociti umani derivata da coltura primaria e caratterizzata da una trasformazione spontanea. Le cellule HaCaT conservano le principali caratteristiche morfologiche epidermiche, presentando una maggiore rapidità di proliferazione e garantendo una migliore riproducibilità sperimentale rispetto ai cheratinociti primari.

Lo studio ha previsto 3 principali fasi di sviluppo: 1. ottimizzazione delle colture cellulari HaCaT indotte al differenziamento; 2. induzione di uno stimolo pro-infiammatorio per ricreare un microambiente psoriasico; 3. esposizione delle cellule a microvescicole isolate dalle colture cresciute nel microambiente psoriasico e trattamenti sperimentali con sostante naturali ad azione anti-infiammatoria. Di seguito sono descritte le metodiche utilizzate e i materiali impiegati. I principali reagenti sono elencati in Tabella 1.

Reagente	**Ditta**
Albumina	Sigma-Aldrich
Bromodesossiuridina (BrdU)	Amersham
Citochine (IL-17, IL-22, IL-23, TNFα)	Prepotech
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	Corning
Etanolo (EtOH)	Carlo Erba, DasitGroup
L-Glutammina	Dominique Dutscher
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Sigma-Aldrich
Penicillina/Streptomicina	Biowest
FBS (Fetal Bovine Serum)	Dominique Dutscher
Tripsina-EDTA	Biowest
Tween-20	Sigma
Hoechst	*Sigma-Aldrich*

Tabella 1: specifiche commerciali dei reagenti utilizzati

1. Modello bidimensionale *in vitro*

1.1 Coltura e mantenimento delle cellule HaCaT

Le cellule HaCaT sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% di penicillina/streptomicina e 1% di L-glutammina. Le colture sono state mantenute in *flask* T25 e T75 in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO_2.

La morfologia cellulare e il grado di confluenza sono stati monitorati quotidianamente mediante osservazione al microscopio ottico rovesciato (Nikon Eclipse E600).

Tutte le procedure descritte sono state eseguite in condizioni sterili sotto cappa a flusso laminare.

Al raggiungimento della sub-confluenza, le cellule sono state distaccate dal substrato di adesione mediante incubazione con 1 ml di tripsina-EDTA per 7-8 minuti a 37°C. La sospensione cellulare ottenuta è stata raccolta in provette da 15 ml e centrifugata a 1200 rpm per 3 minuti.

Dopo la rimozione del surnatante, il *pellet* cellulare è stato risospeso in PBS sterile e sottoposto a un ulteriore lavaggio e successiva centrifugazione a 1200 rpm per 3 minuti, al fine di eliminare eventuali residui di terreno e detriti cellulari.

Dopo aver risospeso il *pellet* in 1 ml di PBS, sono stati prelevati 20 µl per il conteggio mediante camera di Burker. In base alla densità cellulare ottenuta, le cellule sono state seminate in *flask* T75 alla concentrazione di 4 x 10^5 cellule/*flask*, e su vetrini rotondi sterili ad una concentrazione di 10^4 cellule/pozzetto inseriti in piastre *multiwell* da 24 pozzetti.

Le piastre con i vetrini sono state incubate per 20 minuti al fine di favorire l'adesione cellulare prima di aggiungere il volume di terreno completo (500 µl) ad ogni pozzetto. Le colture sono state mantenute in incubatore e monitorate quotidianamente fino ai successivi trattamenti sperimentali.

1.2 Induzione del differenziamento cellulare con $CaCl_2$

Dopo 48h dalla semina, il differenziamento delle cellule HaCaT è stato indotto mediante sostituzione del terreno di coltura con DMEM completo fresco addizionato con $CaCl_2$, alla concentrazione di 1.8 mM. Le cellule sono state mantenute in tali condizioni per 96 h (4 giorni), cambiando il terreno ogni 48 h.

1.3 Trattamento con miscela di citochine proinfiammatorie

Al termine del differenziamento con $CaCl_2$, i campioni HaCaT sono stati suddivisi per creare un gruppo di controllo (CTR) e un gruppo trattato con una miscela (MIX) delle principali citochine coinvolte negli *steps* precoci del processo pro-infiammatorio dell'evento psoriasico. Il MIX è composto da IL-17A [10 ng/ml], IL-22 [20 ng/ml], IL-23 [10 ng/ml], TNF-α [20 ng/ml], le cui concentrazioni sono state definite sulla base di protocolli riferiti a modelli cutanei tridimensionali descritti in letteratura [19] e ridotte di un fattore cinque per l'uso su colture cellulari bidimensionali di cheratinociti.

Dopo 24h e 48h di incubazione, le cellule coltivate su vetrino e destinate alle analisi immunocitochimiche sono state fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% per 10 minuti in agitazione, lavate in PBS e conservate in EtOH al 70% a -20°C.

Le cellule destinate ai saggi di Western blot, coltivate in flask T75, sono state staccate mediante tripsina-EDTA e successivamente centrifugate. I *pellet* cellulari ottenuti sono stati conservati in provette Falcon da 15 mL a -80 °C fino all'esecuzione della lisi cellulare.

Una seconda serie di cellule coltivate in flask T75, trattate con il MIX e destinate all'analisi in citometria a flusso sono state incubate con BrdU per 45 min prima della tripsinizzaione, a cui sono seguite due centrifugazioni per 3 min a 1200 rpm in PBS. La successiva fissazione è stata effettuata risospendendo il *pellet* cellulare con 1 ml fisiologica fredda e 2,3 ml ETOH 96% e conservando poi le provette Falcon da 15 mL a -20 °C fino al momento dell'immunomarcatura e delle analisi.

1.4 Isolamento delle vescicole extracellulari (EVs)

Le cellule sono state coltivate in terreno di differenziamento e suddivise in due gruppi per le due diverse condizioni sperimentali: controllo (CTR) e trattamento con una miscela di citochine psoriasiche (MIX). Dopo 24h e 48h di incubazione, i terreni di coltura sono stati raccolti, mantenuti a +4 °C e spediti al laboratorio della prof. Chiara Porro (Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Foggia) per l'isolamento delle vescicole extracellulari (EVs). In breve, il terreno recuperato da ogni campione (25 ml di volume) è stato centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti per rimuovere le cellule ed eventuali detriti di grandi dimensioni. In seguito, il surnatante è stato sottoposto a successive centrifugazioni a 14.000 rpm per 45 minuti. Le vescicole extracellulari sono state recuperate come *pellet*, risospese in 400 µl di NaCl (0,9% p/v) e conservate a +4°C in frigorifero. [71] La quantificazione delle EVs è stata effettuata mediante dosaggio delle proteine totali associate alle vescicole stesse, utilizzando il Qubit Protein Assay Kit e il Qubit®2.0Fluorometer (Life Technologies, Eugene, OR, USA).

1.5 Trattamento delle cellule HaCaT con EVs

Dalle 4 differenti condizioni sperimentali sono stati isolati i corrispondenti 4 gruppi di vescicole extracellulari EVs CTR 24h, EVs MIX 24h, EVs CTR 48h, EVs MIX 48h. Ciascun campione dei 4 gruppi di EVs è stato successivamente utilizzato per il trattamento di nuove colture cellulari HaCaT differenziate per 4 giorni, al fine di valutare gli effetti biologici associati alle vescicole delle diverse condizioni sperimentali

A tale scopo, le cellule HaCaT sono state seminate su vetrini alla densità di 10^4 cellule/pozzetto e mantenute in DMEM completo, quindi indotte al differenziamento con $CaCl_2$ per quattro giorni, fino al raggiungimento di una confluenza del 60-70%. Successivamente, sono state aggiunte per 24h al terreno le diverse vescicole, ad una concentrazione pari a 10 µg/ml.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati fissati con paraformaldeide (PFA) al 4%, sottoposti a un rapido lavaggio con PBS, post-fissati in EtOH 70% e conservati a -20°C fino alla successiva caratterizzazione immunocitochimica. [62,72]

1.6 Preparazione dell'estratto di *Curcuma caesia* Roxb.

Il fitocomplesso utilizzato nel presente studio è stato ottenuto a partire dai rizomi di *Curcuma caesia* Roxb. (comunemente nota come Curcuma Blu), forniti dall'azienda Agricola Bellaria (Igea Marina, Italia) al laboratorio della prof. Michela Battistelli (Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino Carlo Bo), che ha una collaborazione con la prof Riva. La specie è originaria dell'India, in particolare della regione dell'Andhra Pradesh.

I rizomi sono stati processati all'Università di Urbino, dove inizialmente sono stati tagliati in sezioni sottili, congelati a -80°C e sottoposti a un processo di liofilizzazione per 24 ore. Successivamente, sono stati triturati in mortaio fino all'ottenimento di una polvere fine. Il materiale ottenuto è stato estratto utilizzando una miscela di metanolo e acetone in rapporto 80:20 (v/v), sotto costante agitazione a 600 rpm e alla temperatura di 40°C per 4h.

Al termine, la frazione liquida è stata separata dalla componente solida mediante ultracentrifugazione e filtrazione. Mediante evaporatore rotante è stata ottenuta una massa solida di colore blu-viola, recuperata e conservata a -20°C fino al momento del suo utilizzo. [48]

1.7 Trattamento delle cellule HaCaT con l'estratto di *Curcuma caesia*

Per valutare gli effetti della Curcuma blu in condizioni fisiologiche e in un contesto infiammatorio di tipo psoriasico, sono stati allestiti diversi gruppi sperimentali. In parallelo ai campioni di controllo (CTR), mantenuti in terreno di differenziamento, e ai campioni trattati con la miscela di citochine proinfiammatorie (MIX), le cellule sono state incubate con l'estratto per 24 h (CUR 24h), o 48 h (CUR 48h).

Al fine di valutare l'effetto del fitocomplesso in relazione allo stimolo infiammatorio, sono stati inoltre eseguiti trattamenti sequenziali. In una prima condizione, le cellule sono state pretrattate per 24 h e successivamente esposte al MIX pro-infiammatorio per ulteriori 24 h (CUR 24h → MIX 24h). In una seconda condizione, l'ordine dei trattamenti è stato invertito, esponendo inizialmente le cellule al MIX per 24 h e in seguito all'estratto di *Curcuma caesia* per altre 24 h (MIX 24h → CUR 24h).

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati fissati con paraformaldeide (PFA) al 4%, sottoposti a lavaggio rapido con PBS e conservati in EtOH 70% a -20°C fino alle successive analisi immunocitochimiche.

1.8 Saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU)

La 5-bromo-2'-desossiuridina (BrdU) è stata aggiunta al terreno di coltura DMEM delle cellule HaCaT alla concentrazione di 30 μM ed incubata per 45 minuti prima della fissazionecon paraformaldeide (PFA) al 4%. Successivamente, dopo un rapido lavaggio in PBS, i campioni sono stati post-fissati in EtOH 70% e conservati a -20°C fino all'esecuzione delle successive analisi.

2. Immunocitochimica

2.1 Saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU) per l'analisi citochimica dell'attività proliferativa

Le cellule HaCaT, precedentemente incubate con BrdU, sono state processate per l'analisi immunocitochimica dell'attività proliferativa mediante rilevazione della bromodesossiuridina incorporata nel DNA durante la fase S del ciclo cellulare.

I vetrini, riportati a temperatura ambiente dopo conservazione a -20°C, sono stati lavati in PBS e sottoposti a idrolisi con acido cloridrico HCl 2 N per 30 minuti in agitazione. I campioni sono stati successivamente neutralizzati mediante incubazione con tetraborato di sodio ($Na_2B_4O_7$) 0.1 M per 15 minuti, a cui sono seguiti lavaggi in PBS.

La permeabilizzazione e il blocco dei siti di legame aspecifici sono stati eseguiti mediante incubazione con soluzione PTA (PBS, 0.2% Tween-20, 1% albumina sierica) per 20 minuti in agitazione. In seguito, i campioni sono stati incubati con anticorpo primario monoclonale anti-BrdU di topo (*Amersham, Cytiva*; diluizione 1:100 in PTA) per 1h a temperatura ambiente.

Dopo lavaggi in PTA, i vetrini sono stati incubati con anticorpo secondario *anti-mouse* coniugato con Fluoresceinaisotiocianato (FITC; 1:100 in PTA) per 45 minuti al buio. I campioni sono stati quindi lavati e sottoposti a contro-colorazione nucleare con *Hoechst* 33258 (1:5000 in PBS) per 5 minuti, seguita da lavaggi finali in PBS e osservazione al microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.2 Immunomarcatura delle proteine di giunzione *TJs* e *marker* di differenziamento

I vetrini con le cellule HaCaT, conservati a -20°C, sono stati riportati a temperatura ambiente e lavati con PBS. Successivamente, i campioni sono stati incubati per 20 minuti con soluzione PTA al fine di ottenere la permeabilizzazione delle membrane plasmatiche e il blocco dei siti di legame aspecifici.

L'immunofluorescenza indiretta è stata eseguita per la rilevazione di proteine rappresentative delle giunzioni intercellulari (*Tight Junctions*) nello specifico Claudina-1 (CLDN-1), *Zonula Occludens*-1 (ZO-1) e del differenziamento epidermico, in particolare cheratina 10 (K10).

I campioni sono stati incubati con anticorpi primari diluiti 1:100 in PTA per 1h a temperatura ambiente. In seguito a lavaggi in PTA, le cellule sono state incubate con anticorpi secondari appropriati, coniugati con fluoroforo Alexa Fluor 488 (1:100 in PTA) per 45 minuti al buio.

Dopo ulteriori lavaggi in PTA e PBS, i nuclei sono stati contro-colorati con *Hoechst* 33258 (1:5000 in PBS) per 5 minuti. I vetrini sono stati infine lavati in PBS e analizzati mediante microscopia a fluorescenza (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

In tabella 2 sono riportati i diversi anticorpi utilizzati e le rispettive specifiche commerciali.

Anticorpi Primari e Secondari	Incubazione
Polyclonal rabbit anti-human CLDN-1 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen)	1:100 1 h TA
Polyclonal rabbit anti-human ZO-1 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen)	1:100 1 h TA
Monoclonal mouse anti-human K10 (Santa Cruz Biotechnology)	1:100 1 h TA
Monoclonal mouse anti-human BrdU (Cytiva, Amersham)	1:100 1 h TA
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich)	1:100 45 min TA
Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich)	1:100 45 min TA

Tabella 2: Specifiche relative agli anticorpi utilizzati per l'immunomarcatura findiretta su cellule HaCaT; TA: Temperatura Ambiente

3. Western blot

Il saggio di Western blot è stato eseguito prevalentemente presso il Dipartimento di Scienze biomediche per la salute dell'Università degli Studi di Milano.

I campioni sono stati solubilizzati in *buffer* di lisi RIPA (150mM NaCl, 50mM HEPES, 1% NP-40, 0.1% SDS in acqua distillata) addizionato con un *cocktail* di inibitori delle proteasi (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) e mantenuti in ghiaccio per 5 minuti.

I lisati sono stati quindi centrifugati a 500g per 5 minuti per isolare la frazione proteica citoplasmatica del surnatante. La concentrazione proteica totale è stata determinata mediante saggio BCA (PierceTM BCA Protein Assay Kit, 23225; Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

Per ogni condizione sperimentale, un'aliquota di proteine totali compresa tra 10 e 20 μg è stata caricata su gel SDS-PAGE (in presenza di sodio dodecil solfato) con una concentrazione di poliacrilammide tra il 7,5% e il 15% in funzione del peso molecolare dell'antigene *target*.

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite mediante *elettroblotting* su membrane di nitrocellulosa (Amersham, Little Chalfont, UK).

Per minimizzare i legami aspecifici, le membrane sono state incubate per 30 minuti in una soluzione composta da PBS addizionato con lo 0.2% di Tween-20 e il 5% di latte scremato in polvere come *blocking* per i siti aspecifici. Successivamente, sono state esposte agli anticorpi primari specifici (Tabella 3) diluiti 1:1000 per 1 h a 37°C e poi *over night* a 4°C.

Dopo tre lavaggi in TBS-0.1% Tween 20, le membrane sono state incubate con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (HRP) diluiti 1:2000 per 1 h a 37°C.

In seguito ad ulteriori tre lavaggi in TBS, la visualizzazione delle bande proteiche è stata ottenuta per chemiluminescenza mediante ECL *detection* kit (Euroclone, Milan, Italy) e le immagini sono state acquisite tramite il sistema Bio-Rad ChemiDoc.

La quantificazione dell'intensità del segnale è stata eseguita utilizzando il software *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, USA). I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto alla proteina HSP60, utilizzata come controllo. I livelli di espressione proteica sono stati espressi come *fold change* rispetto al gruppo di controllo (CTR), a cui è stato assegnato un valore di riferimento pari a 1. [6]

Anticorpi Primari e Secondari	**Incubazione**
Polyclonal rabbit anti-human CLDN-1 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen)	1:1000 1 h 37°C e O/N
Polyclonal rabbit anti-human ZO-1 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen)	1:1000 1 h 37°C e O/N
Monoclonal mouse anti-human K10 (Santa Cruz Biotechnology)	1:1000 1 h 37°C e O/N
Monoclonal mouse anti-HSP60 (ThermoFisher Scientific, Invitrogen)	1:1000 1 h 37°C e O/N
Goat anti-rabbit HRP-conjugated (Cell Signaling Technology, USA)	1:2000 1 h 37°C
Goat anti-mouse HRP-conjugated (Cell Signaling Technology, USA)	1:2000 1 h 37°C

Tabella 3: Specifiche relative agli anticorpi utilizzati per Western blot; O/N: Over Night

4. Citometria a flusso

4.1 Saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU) per l'analisi dell'attività proliferativa in citometria a flusso

I campioni precedentemente conservati a -20°C sono stati riportati a temperatura ambiente, centrifugati a 1200 rpm per 3 minuti e, dopo la rimozione del surnatante, le cellule sono state risospese in PBS. Dal campione di controllo (CTR 24h) è stata prelevata una piccola frazione di cellule da destinare al controllo negativo ("bianco"), parallelamente processato ma privato dell'incubazione con l'anticorpo primario, al fine di valutare il segnale di fondo. In seguito a una nuova centrifugazione, i *pellet* cellulari sono stati risospesi in 1 ml di HCl 2N e lasciati in incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente sotto costante agitazione, per consentire l'idrolisi acida e la denaturazione del DNA. Al termine, i campioni sono stati centrifugati, il surnatante rimosso ed è stato aggiunto 1 ml di tetraborato di sodio ($Na_2B_4O_7$) 0.1 M per 15 minuti.

Previa centrifugazione e lavaggio in PBS, le cellule sono state incubate per 20 minuti in soluzione PTA, per il blocco dei siti di legame aspecifici. I campioni sono stati quindi centrifugati e i rispettivi *pellet* risospesi in PTA contenente l'anticorpo primario anti-BrdU (diluito 1:100), per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo lavaggi in PTA, tutti i campioni sono stati incubati con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 (1:100 in PTA) per 45 minuti al buio. In seguito ad ulteriori lavaggi in PTA, i *pellet* cellulari sono stati risospesi in PBS e sottoposti a colorazione stechiometrica del DNA totale mediante aggiunta di Propidio Ioduro (PI) alla concentrazione finale di 5 μg/ml.

Anticorpi Primari e Secondari	Incubazione
Monoclonal mouse anti-human BrdU (Cytiva, Amersham)	1:100 1 h TA
Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich)	1:100 45 min TA

Tabella 4: Specifiche relative agli anticorpi utilizzati in citometria

RISULTATI

1. Effetto dello stimolo psoriasico (MIX) sul modello di cellule HaCaT differenziate

1.1 Analisi Morfologica in microscopia ottica

Le cellule HaCaT cresciute in DMEM completo sono state sottoposte a protocollo di differenziamento con $CaCl_2$ 1,8 mM per ottenere *in vitro* un assetto intercellulare paragonabile agli strati soprabasali dell'epidermide. Successivamente, sono state esposte ad una miscela (MIX) di citochine psoriasiche per intervalli temporali brevi, definiti a 24h e 48h. L'analisi morfologica è stata condotta mediante microscopio rovesciato Nikon Eclipse E600, confrontando i campioni trattati con i rispettivi controlli differenziati non stimolati a ciascun *time-point*. Dopo 24h di incubazione, i campioni esposti alla miscela di citochine proinfiammatorie (Figura 14B) non hanno mostrato apparenti variazioni morfologiche rispetto alla condizione di controllo (Figura 14A). Analogamente, alle 48h di trattamento, non sono stati osservati evidenti cambiamenti morfologici delle cellule esposte al MIX psoriasico (Figura 14D) rispetto al controllo non trattato (Figura 14C).

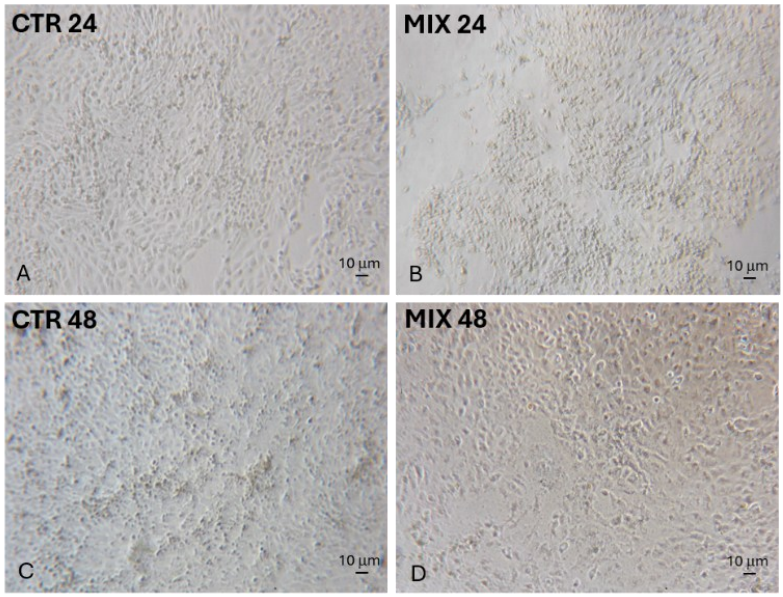


Figura 14: ***Analisi morfologica di cheratinociti umani HaCaT in coltura mediante microscopia ottica.*** *Immagini rappresentative di cellule HaCaT indotte al differenziamento per 4 giorni con 1.8 mM di $CaCl_2$, analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza di uno stimolo proinfiammatorio psoriasico. (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento. (B) Cellule HaCaT esposte al cocktail citochinico (MIX: IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα) per 24h. (C) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento. (D) Cellule HaCaT trattate col MIX per*

48 h. Le immagini sono state acquisite mediante microscopio rovesciato Nikon Eclipse E600. [Scale bar: 10 µm]

1.2 Analisi dell'attività proliferativa

Allo scopo di valutare l'effetto dello stimolo psoriasico sulla capacità di proliferazione cellulare, è stata determinata la percentuale di cellule HaCaT in attiva fase di sintesi del DNA mediante il saggio di incorporazione di Bromodesossiuridina (BrdU). Le immagini di immunomarcatura anti-BrdU (Figura 15) mostrano una evidente positività, confermata dall'analisi quantitativa basata sul conteggio percentuale delle cellule BrdU-positive.

Al 6° giorno di differenziamento, corrispondente al CTR 48h (Figura 15C) è stata osservata una minore incorporazione della BrdU da parte delle cellule HaCaT, rispetto al 5° giorno di differenziamento (Figura 15A) in modo significativo ($p < 0,01$). Inoltre, è stata notata una significativa riduzione ($p < 0,05$) dell'attività proliferativa sia nei campioni esposti alla miscela proinfiammatoria per 24h (Figura 15B), rispetto al controllo relativo allo stesso tempo (Figura 15A), sia nelle cellule trattate con il MIX per 48 h (Figura 15D), rispetto al corrispondente controllo al medesimo *time-point* (Figura 15C).

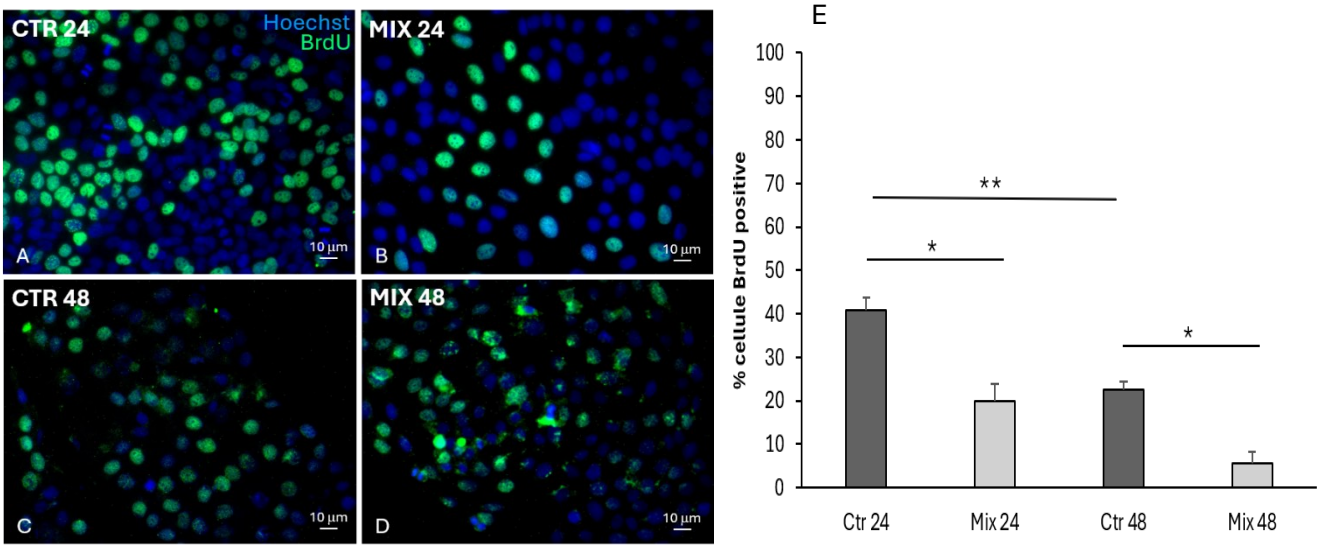


*Figura 15: **Analisi dell'attività delle cellule HaCaT differenziate e trattate con MIX**. Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (Zeiss Axiophot) relative all'immunomarcatura per BrdU in cellule di controllo CTR (A e C) e trattate con miscela MIX di citochine psoriasiche (B e D) per 24 e 48h rispettivamente. I nuclei cellulari BrdU positivi sono marcati in verde; tutti i nuclei sono controcolorati con Hoechst 33258. (E) Valutazione quantitativa della percentuale di cellule BrdU-positive rispetto al numero totale di cellule nei rispettivi time-point e nelle 4 condizioni sperimentali.*

I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). La significatività statistica tra i gruppi è espressa come p<0,05 (*) e p<0,01 (**).

1.3 Giunzioni cellulari occludenti e *Tight Junctions (TJs)*

L'espressione e la localizzazione delle proteine di giunzione occludente Claudina-1 (CLDN-1) e *Zonula Occludens*-1 (ZO-1) sono state osservate tramite microscopia a fluorescenza nei campioni trattati e non trattati alle tempistiche di 24 e 48h e mediante analisi quantitativa in Western blot.

1.3.1 Claudina-1 (CLDN-1)

L'analisi dell'immunomarcatura per la proteina Claudina-1 (CLDN-1) nei campioni di controllo di cellule HaCaT differenziate al quinto e sesto giorno (24h e 48 h, rispettivamente) (Figura 16A e 16C), ha rivelato un segnale fluorescente intenso e uniformemente distribuito lungo l'intero perimetro della membrana cellulare. Tale distribuzione riflette la tipica e fisiologica localizzazione della proteina transmembrana a livello delle giunzioni occludenti (*Tight Junctions*, TJ).

Diversamente, nei campioni trattati (Figura 16B e 16D), esposti alla miscela di citochine psoriasiche è stata osservata una marcata riduzione dell'intensità del segnale di fluorescenza associato a CLDN-1 a 24h, mantenuta anche alle 48h.

L'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza del segnale (Figura 16E) supporta il *trend* di riduzione osservato qualitativamente; tuttavia, le differenze tra i campioni di controllo e i rispettivi campioni trattati non sono risultate statisticamente significative.

La valutazione quantitativa dell'espressione proteica totale mediante Western blot (Figura 16F) conferma il dato immunocitochimico, mostrando una lieve diminuzione non significativa dei livelli di CLDN-1 dopo il trattamento con MIX rispetto ai corrispondenti controlli.

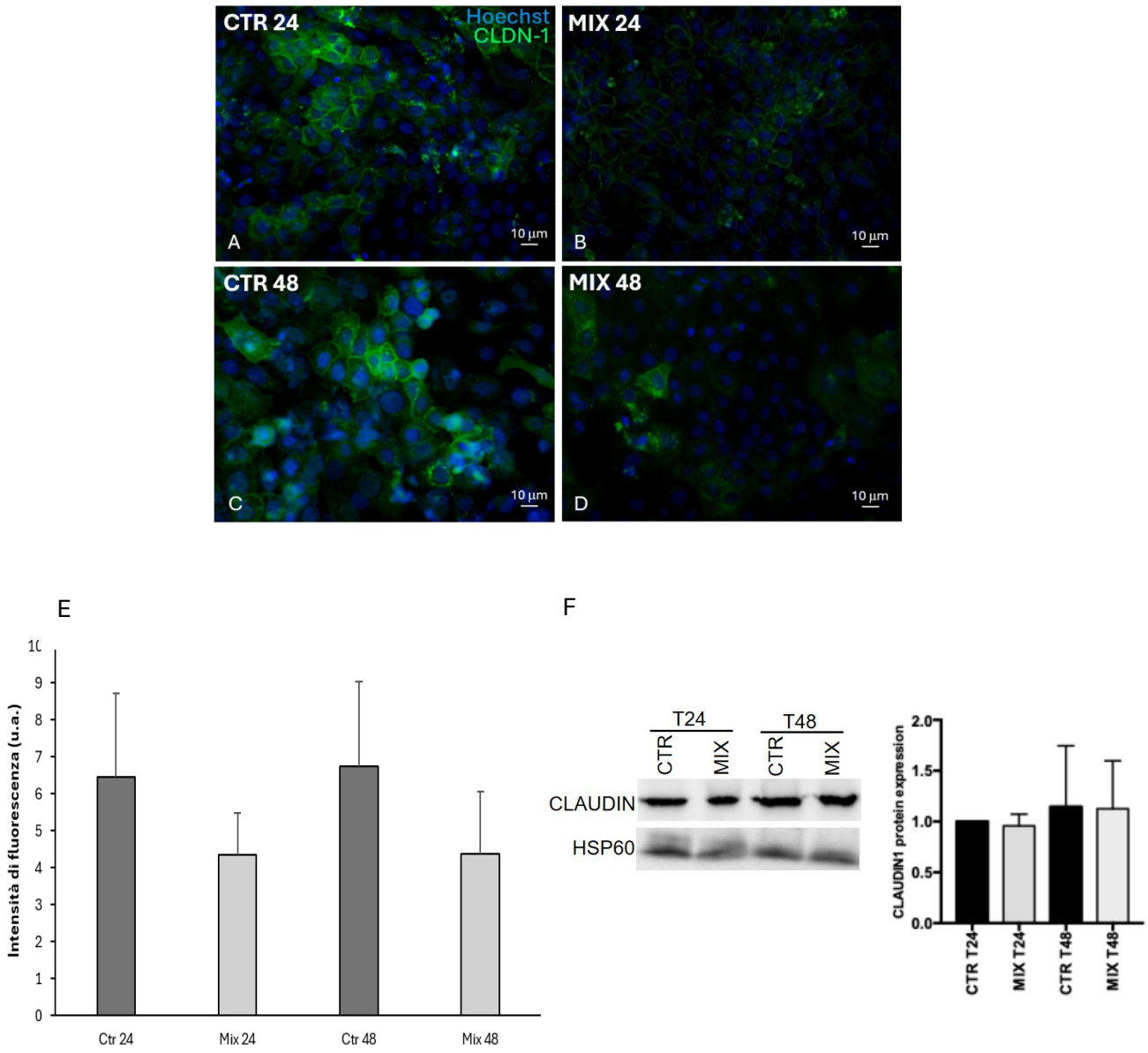


Figura 16: ***Analisi in immunofluorescenza dell'espressione e della localizzazione cellulare di Claudina-1 (CLDN-1) in cheratinociti HaCaT.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per CLDN-1 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT indotte al differenziamento e analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza del MIX psoriasico. I nuclei sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A) Cellule di controllo CTR a 24 h. (B) Cellule stimolate con la miscela psoriasica MIX per 24h. (C) Cellule di controllo a 48 h. (D) Cellule trattate con la miscela citochinica per 48h. Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 µm] (E) Quantificazione dell'intensità di fluorescenza espressa in unità arbitrarie (u.a.) per ciascuna condizione sperimentale, eseguita mediante il software ImageJ. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). (F) Quantificazione dell'espressione proteica mediante Western Blot, con analisi densitometrica delle bande proteiche normalizzate rispetto*

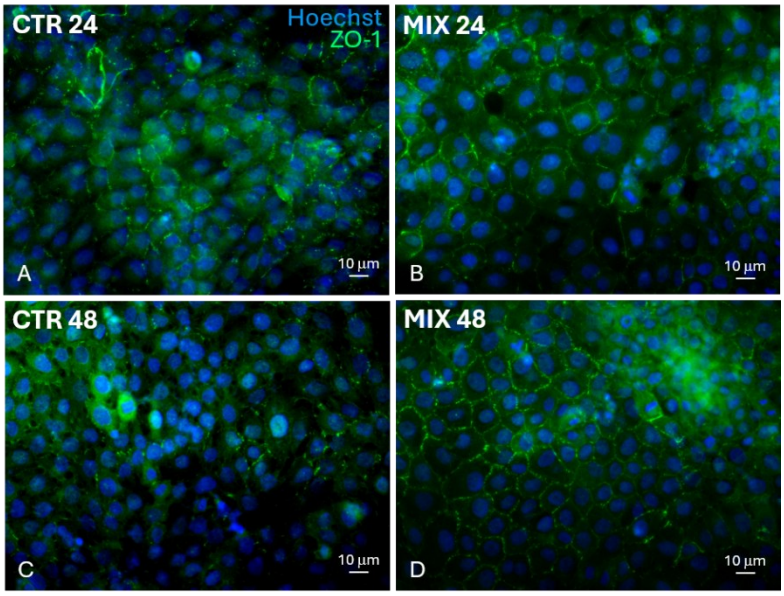
HSP60, con rappresentazione del fold change relativo ai controlli a 24 ore. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD).

1.3.2 Zonula Occludens-1 (ZO-1)

In tutti i campioni esaminati, la proteina citoplasmatica di *scaffold* Zonula Occludens-1 (ZO-1) ha mostrato una distribuzione per lo più puntinata, a ridosso dei bordi citoplasmatici della membrana cellulare.

Nei campioni di controllo a 24 e 48 h (Figura 17A e 17C), il segnale fluorescente è risultato distribuito in modo omogeneo tra le cellule. L'esposizione alla miscela di citochine proinfiammatorie non ha evidenziato cambiamenti rispetto ai controlli, sia a 24h (Figura 17B) sia a 48h (Figura 17D); infatti, l'intensità di fluorescenza e l'organizzazione di ZO-1 sono risultate sovrapponibili a quelle dei rispettivi controlli.

Queste osservazioni sono state confermate dalle analisi quantitative dell'intensità di fluorescenza (Figura 17E) e analisi biochimica mediante Western blot (Figura 17F), che mostrano variazioni non significative della proteina.



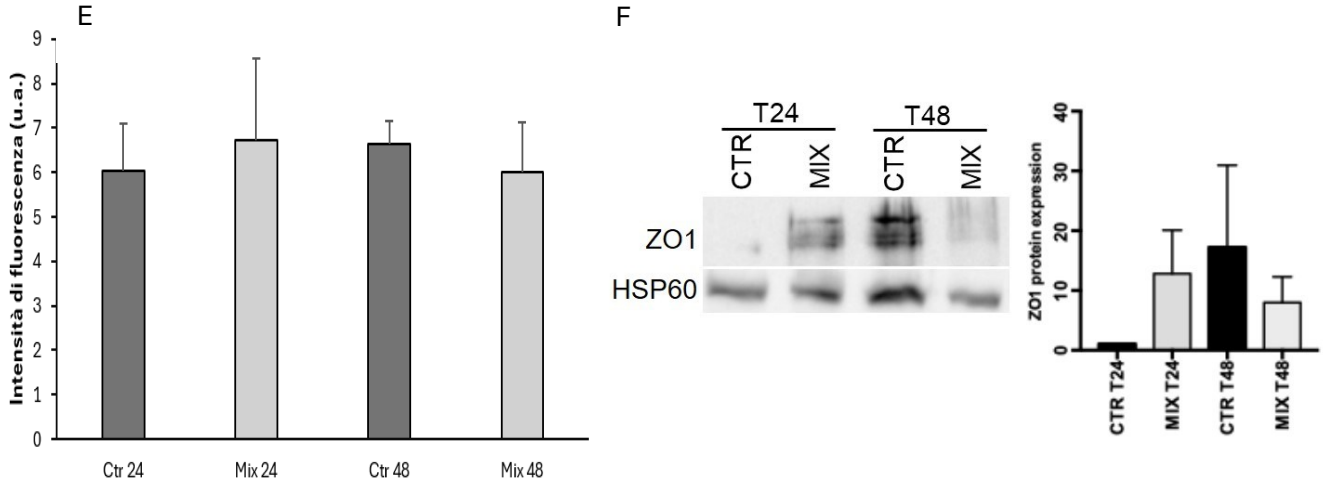


Figura 17: ***Analisi in immunofluorescenza dell'espressione e della localizzazione cellulare di Zonula Occludens-1 (ZO-1) in cheratinociti HaCaT.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per ZO-1 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT differenziate e analizzate a 24 e 48 h in presenza o assenza del MIX psoriasico. I nuclei cellulari sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A) Cellule di controllo CTR a 24h. (B) Cellule trattate con la miscela psoriasica MIX per 24h. (C) Cellule di controllo a 48h. (D) Cellule trattate con la miscela citochinica per 48h. Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 μm] (E) Quantificazione dell'intensità di fluorescenza espressa in unità arbitrarie (u.a.) per ciascuna condizione sperimentale, eseguita mediante il software ImageJ. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). (F) Quantificazione dell'espressione proteica mediante Western Blot, con analisi densitometrica delle bande proteiche normalizzate rispetto HSP60, con rappresentazione del fold change relativo ai controlli a 24 ore. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD).*

1.4 Analisi del differenziamento cellulare: valutazione della cheratina K10

Il segnale fluorescente verde relativo all'immunomarcatura per la citocheratina 10 (K10) è presente in entrambe le condizioni di controllo CTR 24h e CTR 48h (Figura 18A e 18C), confermando un iniziale differenziamento cheratinocitario. La proteina ha mostrato una distribuzione per lo più citoplasmatica, e in alcune cellule anche a livello dell'area perinucleare.

L'esposizione alla miscela di citochine psoriasiche MIX ha indotto una riduzione del segnale, visibile sia a 24 h (Figura 18B) sia a 48 h (Figura 18D), accompagnata da un calo di cellule positive per K10 rispetto ai rispettivi campioni di controllo.

L'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza (Figura 18E) evidenzia una riduzione significativa del segnale nei campioni trattati con MIX rispetto al controllo a 24h. Anche a 48h si osserva una diminuzione, sebbene il confronto con il rispettivo controllo non risulti statisticamente significativo.

La valutazione quantitativa dell'espressione proteica totale mediante Western blot (Figura 18F) mostra che i livelli complessivi di K10 non sono cambiati dopo il trattamento con MIX.

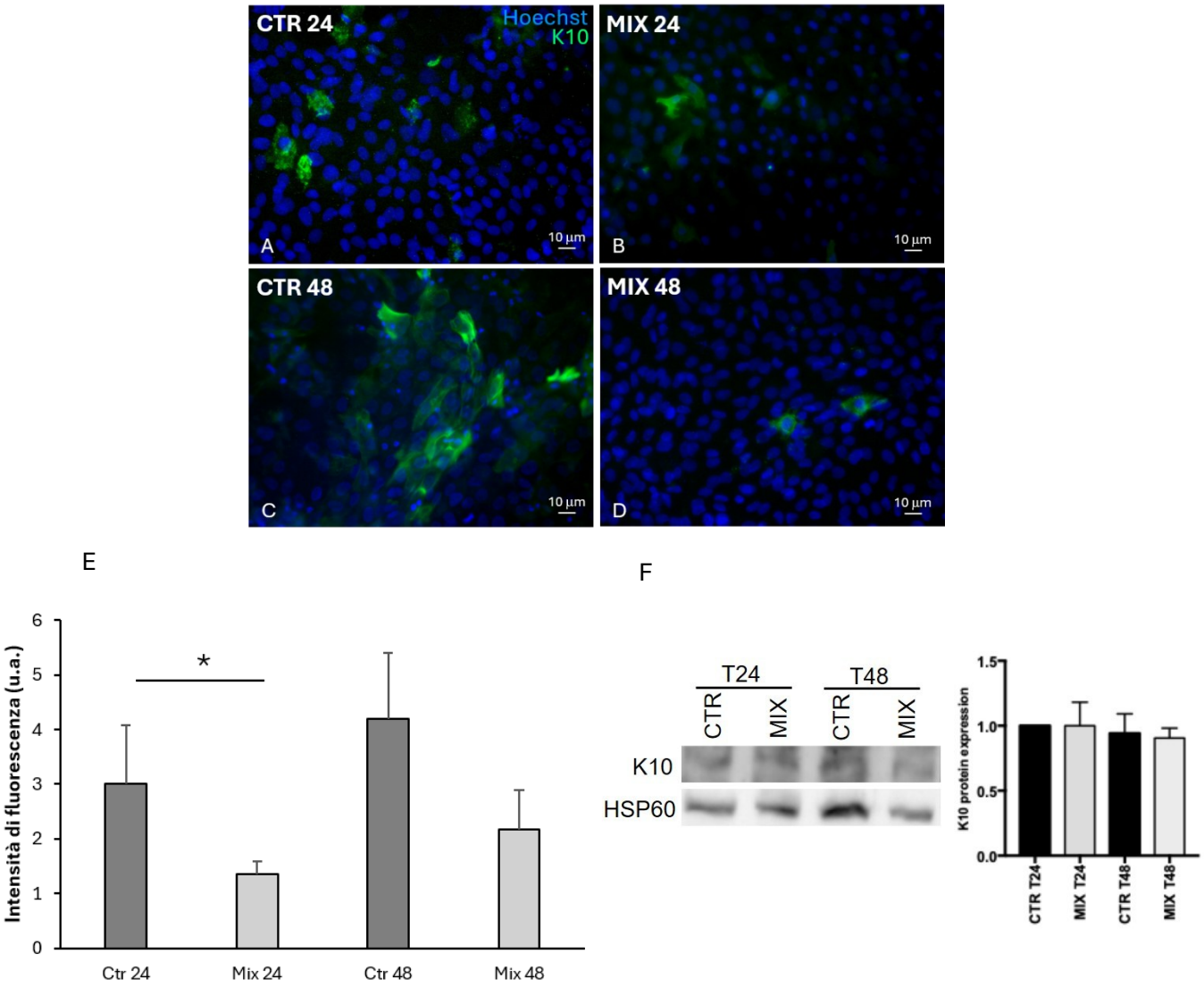


Figura 18: ***Analisi in immunofluorescenza dell'espressione e della localizzazione cellulare della citocheratina 10 (K10) in cheratinociti HaCaT.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per K10 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT differenziate e analizzate a 24 e 48h in presenza o assenza del MIX psoriasico. I nuclei cellulari sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A) Cellule di controllo a 24h. (B) Cellule trattate con la miscela citochinica per 24h. (C) Cellule di controllo a 48h. (D) Cellule trattate con la miscela psoriasica per 48h. Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 µm] (E) Quantificazione dell'intensità di fluorescenza espressa in unità arbitrarie (u.a.) per ciascuna*

condizione sperimentale, eseguita mediante il software ImageJ. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). La significatività statistica tra i gruppi è espressa come p<0,05 (*). (F) Quantificazione dell'espressione proteica mediante Western Blot, con analisi densitometrica delle bande proteiche normalizzate rispetto HSP60, con rappresentazione del fold change relativo ai controlli a 24 ore. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD).

2. Effetto delle Vescicole Extracellulari (EVs) sul modello HaCaT differenziato

2.1 Aspetti morfologici cellulari

Per valutare il potenziale effetto delle vescicole extracellulari (EVs) sulla morfologia cellulare, sono stati preparati campioni di cellule HaCaT differenziate ed esposte alle EVs isolate a 24h e 48h dalle cellule di controllo cresciute in condizioni basali (EVs CTR 24h ed EVs CTR 48h) e dalle cellule esposte al microambiente psoriasico (EVs MIX 24h ed EVs MIX 48h).

Dall'osservazione al microscopio ottico rovesciato Nikon Eclipse E600 non sono emersi cambiamenti morfologici evidenti. L'aspetto e l'organizzazione delle cellule trattate con le vescicole provenienti dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 24 e 48h (Figura 19D e 19H) e di quelle trattate con le vescicole provenienti dall'ambiente basale a 24 e 48h (Figura 19C e 19G) sono risultati simili tra di loro e anche rispetto ai campioni di riferimento. Pertanto, sulla base di queste osservazioni qualitative, l'esposizione alle EVs non sembra indurre alterazioni macroscopiche della morfologia cellulare nei tempi analizzati.

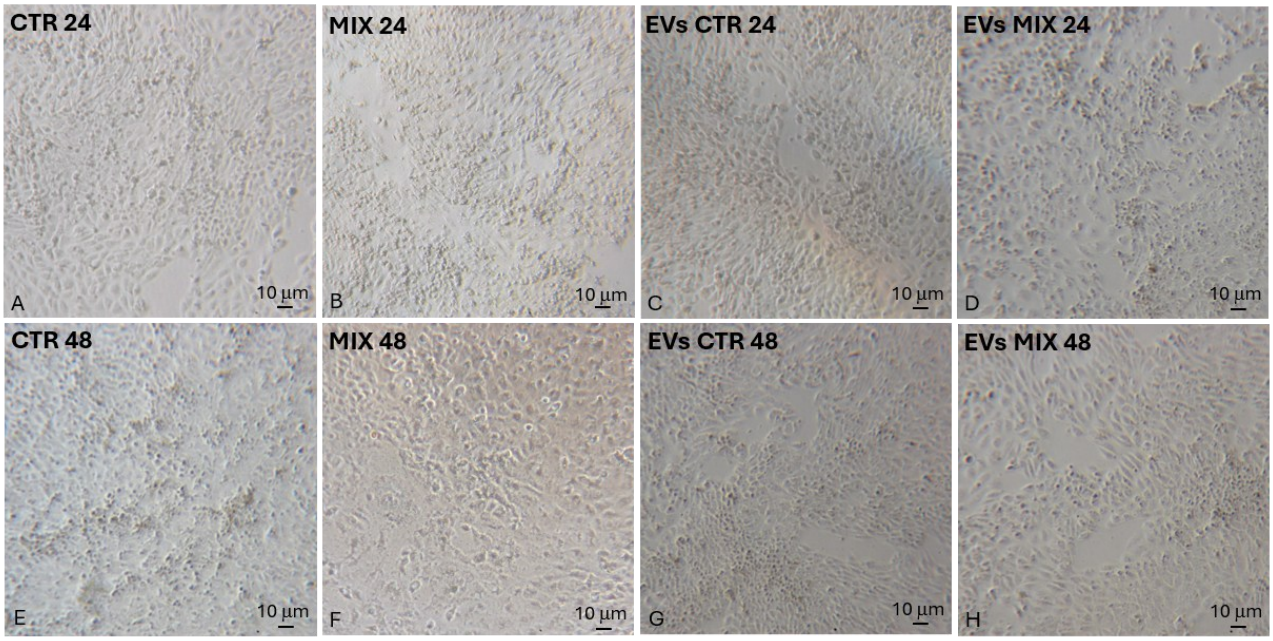


Figura 19: ***Analisi morfologica di cheratinociti umani HaCaT in coltura mediante microscopia ottica.*** *Immagini rappresentative di cellule HaCaT indotte al differenziamento e trattate con Vescicole Extracellulari (EVs). (A-D) Campioni analizzati a 24h: (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule HaCaT differenziate esposte al cocktail citochinico (MIX: IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα) per 24h; (C) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 24h (EVs CTR 24h); (D) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 24h (EVs MIX 24h); (E-H) Campioni analizzati a 48h: (E) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (F) Cellule HaCaT differenziate trattate col MIX per 48h; (G) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 48h (EVs CTR 48h); (H) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 48h (EVs MIX 48h). Le immagini sono state acquisite mediante microscopio rovesciato Nikon Eclipse E600. [Scale bar: 10 μm]*

2.2 Attività proliferativa

Per valutare l'effetto delle vescicole extracellulari sull'attività proliferativa dei cheratinociti HaCaT differenziati è stato eseguito il saggio di incorporazione della Bromodesossiuridina (BrdU).

Dall'analisi quantitativa è emerso un andamento simile tra lo stimolo diretto del MIX sulle cellule e quello mediato dalle vescicole, sia a 24h sia a 48h.

Le cellule HaCaT a contatto con le vescicole isolate dai controlli (EVs CTR 24h e EVs CTR 48h; Figura 20C e 20G) mostrano un profilo di attività proliferativa analogo a quello delle stesse cellule di controllo ai medesimi tempi (CTR 24h e CTR 48h; Figura 20A e 20E). A 48h si osserva un incremento della proliferazione, che risulta statisticamente significativo ($p < 0,05$). In modo analogo, le vescicole psoriasiche (EVs MIX 24h e EVs MIX 48h; Figura 20G e 20H), mostrano un andamento comparabile a quello osservato in seguito allo stimolo diretto con MIX (MIX 24h e MIX 48h; Figura 20E e 20F), con una riduzione dell'attività proliferativa rispetto ai corrispondenti controlli, statisticamente significativa alle 24h ($p < 0,05$).

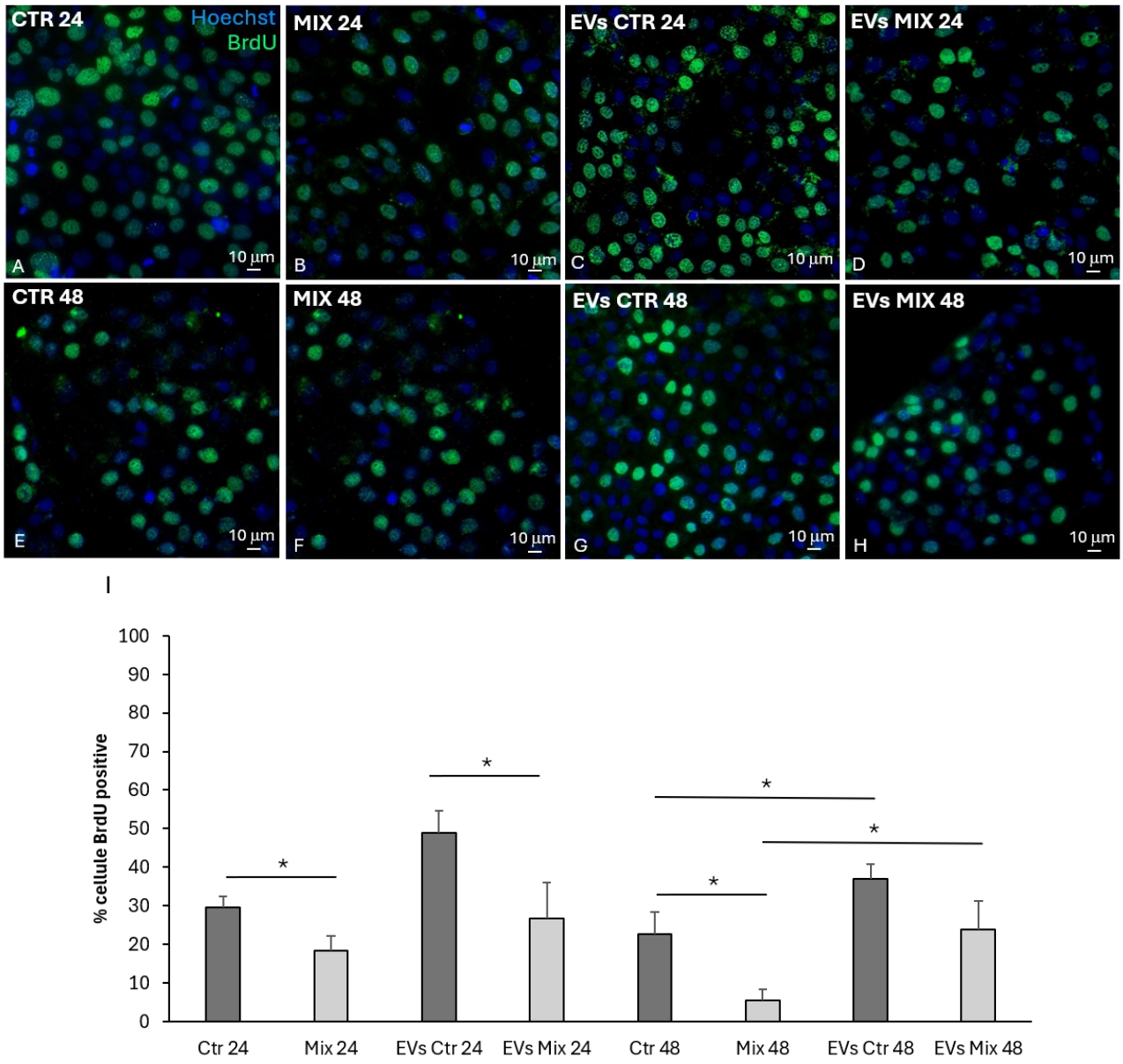


Figura 20: ***Analisi dell'attività proliferativa delle cellule HaCaT differenziate e trattate con Vescicole Extracellulari (EVs)****. Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (Zeiss Axiophot) relative all'immunomarcatura per BrdU. I nuclei in attiva fase S di sintesi del DNA sono BrdU positivi e con fluorescenza verde. Tutti i nuclei delle cellule sono controcolorati con Hoechst 33258 (fluorescenza blu). (A-D) Campioni analizzati a 24h: (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule HaCaT differenziate esposte al cocktail citochinico (MIX: IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα) per 24h; (C) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 24h (EVs CTR 24h); (D) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 24h (EVs MIX 24h); (E-H) Campioni analizzati a 48h: (E) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (F) Cellule HaCaT differenziate trattate col MIX per 48h; (G) Nuove colture*

differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 48h (EVs CTR 48h); (H) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 48h (EVs MIX 48h). Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 μm] (I) Valutazione quantitativa della percentuale di cellule BrdU-positive rispetto al numero totale di cellule nei rispettivi time-points e condizioni sperimentali. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). La significatività statistica tra i gruppi è espressa come p<0,05 (*).

Per un'ulteriore valutazione quantitativa sono state avviate anche analisi in citometria a flusso, di cui riporto solo dati preliminari relativi a 24h, a conferma del *trend* osservato con l'analisi immunocitochimica in microscopia a fluorescenza. Le EVs isolate dai terreni di coltura dopo 24h e 48h di esposizione alla miscela di citochine psoriasiche hanno inibito l'attività proliferativa delle cellule HaCaT, che risultano bloccate in fase G1 del ciclo cellulare (Figura 21D e 21F, rispettivamente). Le vescicole derivate dai controlli EVs CTR 24h e 48h hanno indotto addirittura un effetto proliferativo, come evidente dalla distribuzione «a ferro di cavallo» della popolazione cellulare (Figura 21C e 21E)

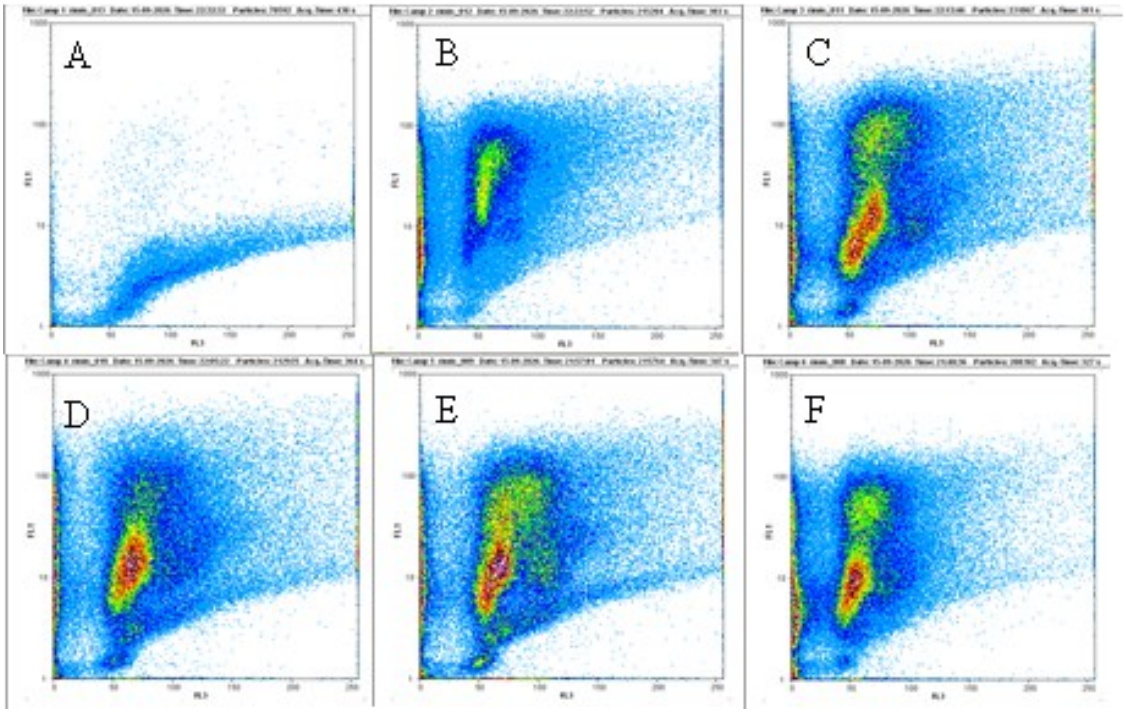


Figura 21: ***Analisi preliminare dell'attività proliferativa mediante saggio BrdU e citometria a flusso.*** *I quadri FSC/SCC rappresentano la distribuzione «a ferro di cavallo» della popolazione cellulare BrdU positiva in funzione delle fasi del ciclo cellulare. Scatter del background dovuto alla presenza del solo anticorpo II (A); CTR 24h (B); EVs CTR 24h (C); EVs MIX 24h (D); EVs CTR 48h (E); EVs MIX 48h (F).*

2.3 Giunzioni cellulari: *TJs*

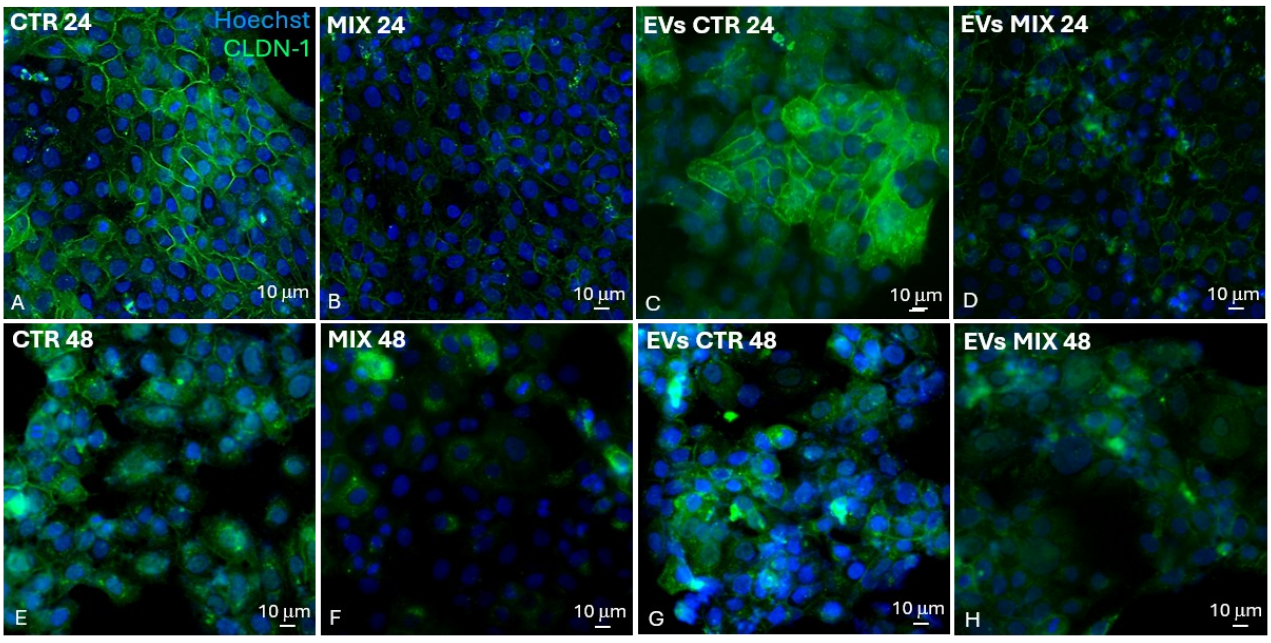
La localizzazione delle proteine di giunzione Claudina-1 (CLDN-1) e *Zonula Occludens*-1 (ZO-1) è stata osservata nei diversi campioni tramite microscopia a fluorescenza.

2.3.1 Claudina-1 (CLDN-1)

Le cellule HaCaT appartenenti al *set* di condizioni di controllo mostrano un comportamento sostanzialmente sovrapponibile. Sia nei controlli diretti a 24 e 48 h (Figura 22A e 22E), sia nei campioni trattati con le vescicole isolate dal terreno di controllo (EVs CTR 24h e EVs CTR 48h; Figura 22C e 22G), la Claudina-1 emette una fluorescenza verde intensa e nitida. In tutti questi campioni, la proteina mostra una localizzazione transmembrana, disegnando una linea continua che delimita il perimetro cellulare.

Quando alle cellule viene fornito lo stimolo infiammatorio psoriasico, la situazione cambia e l'andamento risulta simile in tutti i campioni esposti al MIX. Il trattamento citochinico diretto provoca una lieve diminuzione dell'intensità di fluorescenza, visibile sia a 24h (Figura 22B) sia a 48h (Figura 22F). In modo analogo, le cellule HaCaT trattate con le vescicole provenienti dal microambiente psoriasico (EVs MIX 24h e EVs MIX 48h; Figura 22D e 22H) mostrano una riduzione del segnale sovrapponibile allo stimolo diretto. La fluorescenza di CLDN-1 diminuisce d'intensità e i contorni cellulari appaiono meno definiti, quasi sfumati. Questo effetto risulta particolarmente evidente alle 48h (MIX 48h ed EVs MIX 48h).

L'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza (Figura 22 I) conferma il *trend* di riduzione della proteina osservato al microscopio.



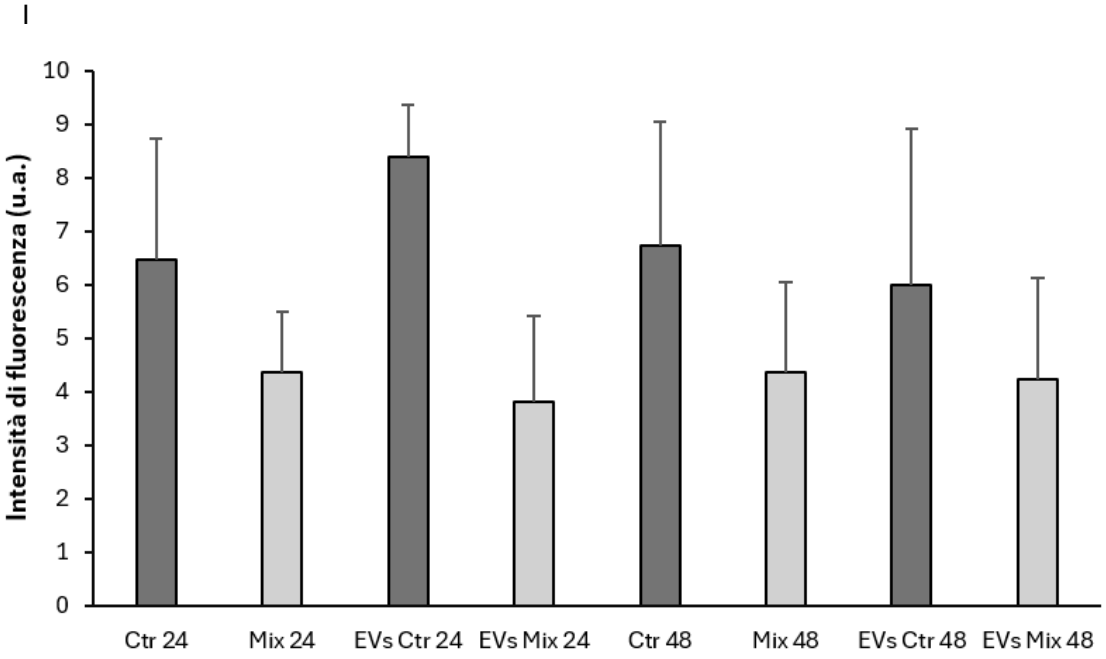


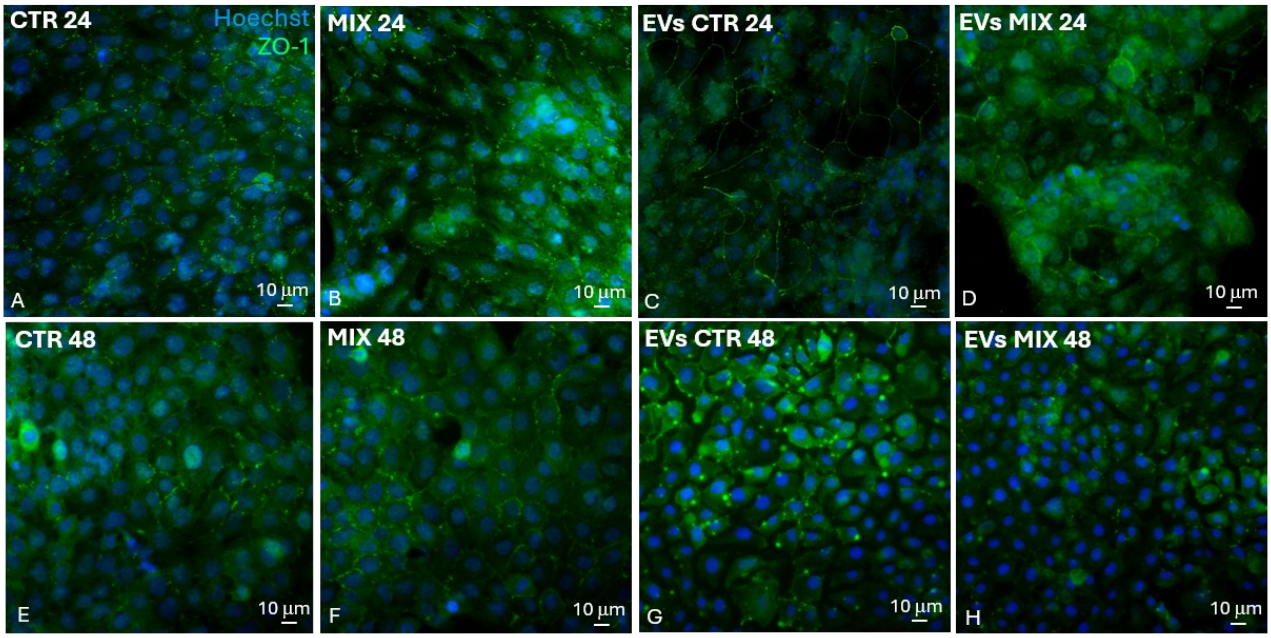
Figura 22: ***Analisi in immunofluorescenza di Claudina-1 (CLDN-1) in cheratinociti HaCaT.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per CLDN-1 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT indotte al differenziamento e analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza del MIX psoriasico o in seguito a trattamento con Vescicole Extracellulari (EVs). I nuclei sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A-D) Campioni analizzati a 24h: (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule HaCaT differenziate esposte al cocktail citochinico (MIX: IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα) per 24h; (C) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 24h (EVs CTR 24h); (D) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 24h (EVs MIX 24h); (E-H) Campioni analizzati a 48h: (E) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (F) Cellule HaCaT differenziate trattate col MIX per 48h; (G) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 48h (EVs CTR 48h); (H) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 48h (EVs MIX 48h). Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 μm] (I) Quantificazione dell'intensità di fluorescenza espressa in unità arbitrarie (u.a.) per ciascuna condizione sperimentale, eseguita mediante il software ImageJ. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD).*

2.3.2 Zonula Occludens-1 (ZO-1)

Nei campioni di controllo (CTR 24h e CTR 48h; Figura 23A e 23E) e nei campioni di cellule HaCaT trattate con le vescicole isolate da microambiente sano sia a 24 sia a 48h (EVs CTR 24h e EVs CTR 48h; Figura 23C e 23G) la proteina ZO-1 mostra una distribuzione puntinata (continua solo in alcuni spazi) disposta in modo ordinato e geometrico lungo i bordi cellulari.

L'esposizione diretta al MIX di citochine infiammatorie (MIX 24h e MIX 48h; Figura 23B e 23F) e alle vescicole provenienti dal microambiente patologico (EVs MIX 24h e EVs MIX 48h; Figura 23D e 23H) non sembra causare alterazioni rispetto alle condizioni di controllo. Il segnale mantiene livelli simili di intensità di fluorescenza e la stessa distribuzione a puntini, per lo più a livello intracitoplasmatico, a ridosso della membrana cellulare.

Nel *range* temporale esaminato, lo stimolo infiammatorio diretto e il relativo effetto mediato dalle vescicole extracellulari non sembrano alterare la distribuzione e la localizzazione della proteina ZO-1. L'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza (Figura 23I) conferma le osservazioni microscopiche.



I

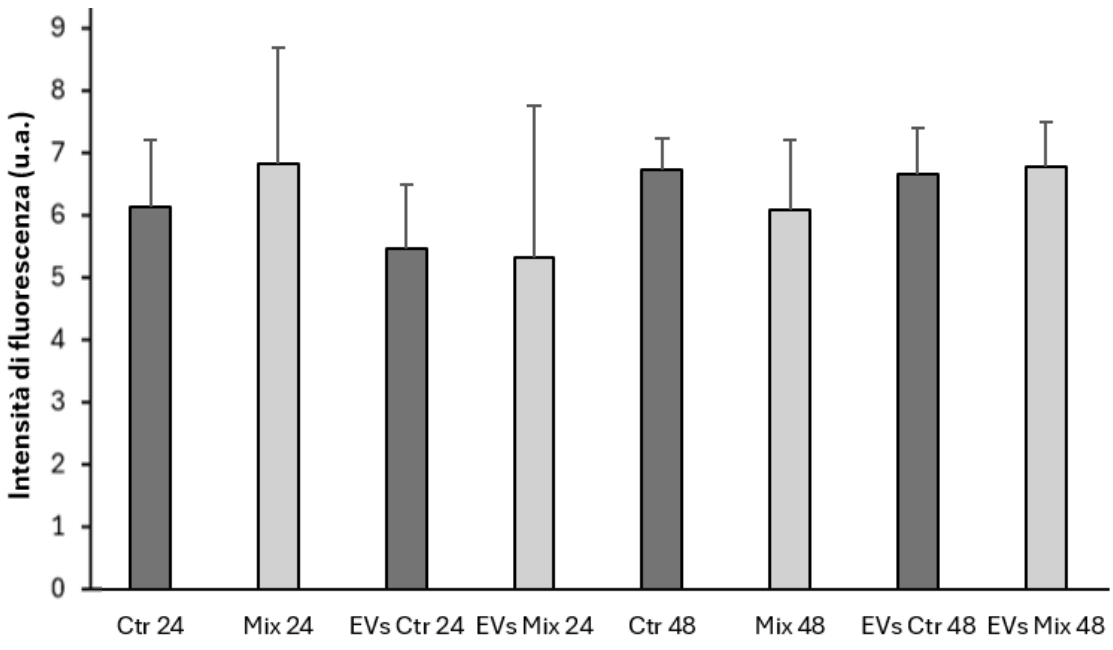


Figura 23: ***Analisi in immunofluorescenza di Zonula Occludens-1 (ZO-1) in cheratinociti HaCaT.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per ZO-1 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT indotte al differenziamento e analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza del MIX psoriasico o in seguito a trattamento con Vescicole Extracellulari (EVs). I nuclei sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A-D) Campioni analizzati a 24h: (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule HaCaT differenziate esposte al cocktail citochinico (MIX: IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα) per 24h; (C) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 24h (EVs CTR 24h); (D) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 24h (EVs MIX 24h); (E-H) Campioni analizzati a 48h: (E) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (F) Cellule HaCaT differenziate trattate col MIX per 48h; (G) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 48h (EVs CTR 48h); (H) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 48h (EVs MIX 48h). Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 μm] (I) Quantificazione dell'intensità di fluorescenza espressa in unità arbitrarie (u.a.) per ciascuna condizione sperimentale, eseguita mediante il software ImageJ. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD).*

2.4 Analisi del differenziamento attraverso la cheratina K10

Le cellule HaCaT appartenenti al set di condizioni di controllo mostrano un comportamento sostanzialmente sovrapponibile. Nei campioni basali a 24h e 48h (CTR 24h e CTR 48h; Figura 24A e 24E) e nei campioni trattati con le vescicole isolate da microambiente sano a 24 e 48h (EVs CTR 24h e EVs CTR 48h; Figura 24C e 24G), la proteina K10 mostra una marcata espressione a livello citoplasmatico, distribuita in modo diffuso e omogeneo.

Quando le cellule vengono esposte allo stimolo infiammatorio psoriasico, si osserva un andamento costante tra le diverse condizioni del set patologico, caratterizzato da una riduzione generalizzata del segnale rispetto al blocco di controllo. Infatti, sia il trattamento citochinico diretto a 24 e 48h (MIX 24h e MIX 48h; Figura 24B e 24F), sia l'esposizione alle vescicole provenienti dal microambiente citochinico proinfiammatorio (EVs MIX 24h e EVs MIX 48h; Figura 24D e 24H) provocano un calo dell'intensità di fluorescenza della citocheratina 10. In tutti i campioni del set patologico le marcature citoplasmatiche risultano meno presenti, fino ad essere praticamente assenti nel campione EVs MIX 48h.

Nel *range* temporale esaminato, lo stimolo infiammatorio diretto del MIX e il relativo effetto mediato dalle vescicole extracellulari derivanti dalle cellule trattate con lo stimolo citochinico inducono una riduzione del segnale fluorescente relativo al *marker* di differenziamento K10.

L'analisi quantitativa dell'intensità di fluorescenza (Figura 24I) conferma il risultato qualitativo dell'osservazione al microscopio.

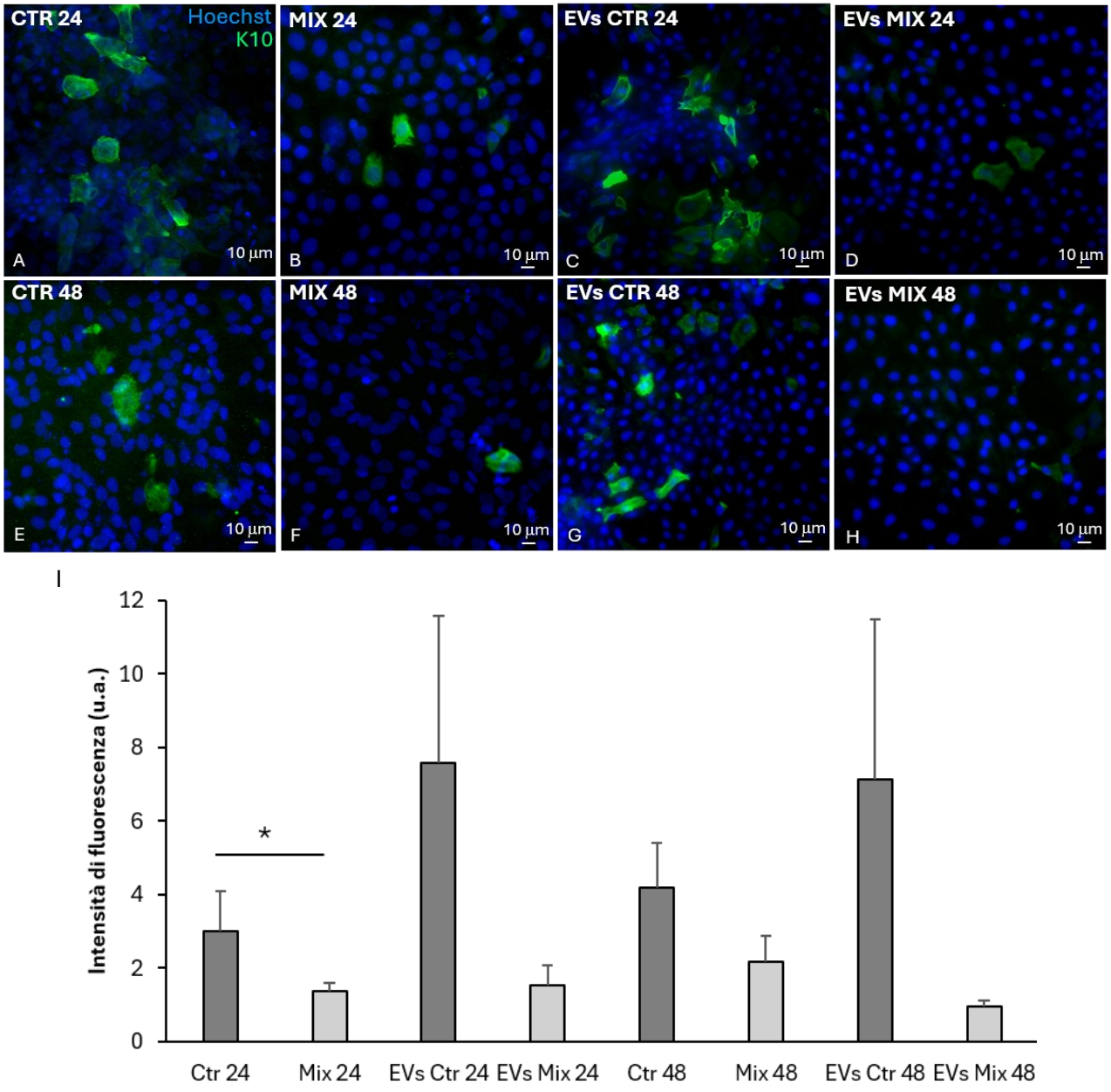


Figura 24: ***Analisi in immunofluorescenza dell'espressione e della localizzazione cellulare della citocheratina 10 (K10) in cheratinociti HaCaT.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per K10 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT indotte al differenziamento e analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza del MIX psoriasico o in seguito a trattamento con Vescicole Extracellulari (EVs). I nuclei sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A-D)*

Campioni analizzati a 24h: (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule HaCaT differenziate esposte al cocktail citochinico (MIX: IL-17A, IL-22, IL-23, TNFα) per 24h; (C) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 24h (EVs CTR 24h); (D) Nuove colture di cellule HaCaT differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 24h (EVs MIX 24h); (E-H) Campioni analizzati a 48h: (E) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (F) Cellule HaCaT differenziate trattate col MIX per 48h; (G) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente basale a 48h (EVs CTR 48h); (H) Nuove colture differenziate esposte per 24h alle EVs isolate dall'ambiente infiammatorio psoriasico a 48h (EVs MIX 48h). Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 μm] (I) Quantificazione dell'intensità di fluorescenza espressa in unità arbitrarie (u.a.) per ciascuna condizione sperimentale, eseguita mediante il software ImageJ. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). La significatività statistica tra i gruppi è espressa come $p<0,05$ (*).

3. Effetto biologico di una sostanza biogena naturale (*Curcuma caesia* Roxb.) sul modello di cellule HaCaT differenziate

Per valutare preliminarmente il potenziale effetto della sostanza naturale biogena *Curcuma caesia* Roxb. sulle cellule HaCaT differenziate sono stati allestiti campioni trattati direttamente con il composto biogeno per 24 e 48h (CUR 24h e CUR 48h).

Allo stesso tempo, per valutarne l'efficacia anti-infiammatoria della curcuma in un contesto proinfiammatorio psoriasico, sono stati preparati sia campioni differenziati pretrattati con curcuma per 24h e successivamente esposti al MIX citochinico per ulteriori 24h (CUR 24h → MIX 24h), sia campioni differenziati sottoposti a post-trattamento, esposti al MIX per 24h e poi al composto naturale per altre 24h (MIX 24h → CUR 24h).

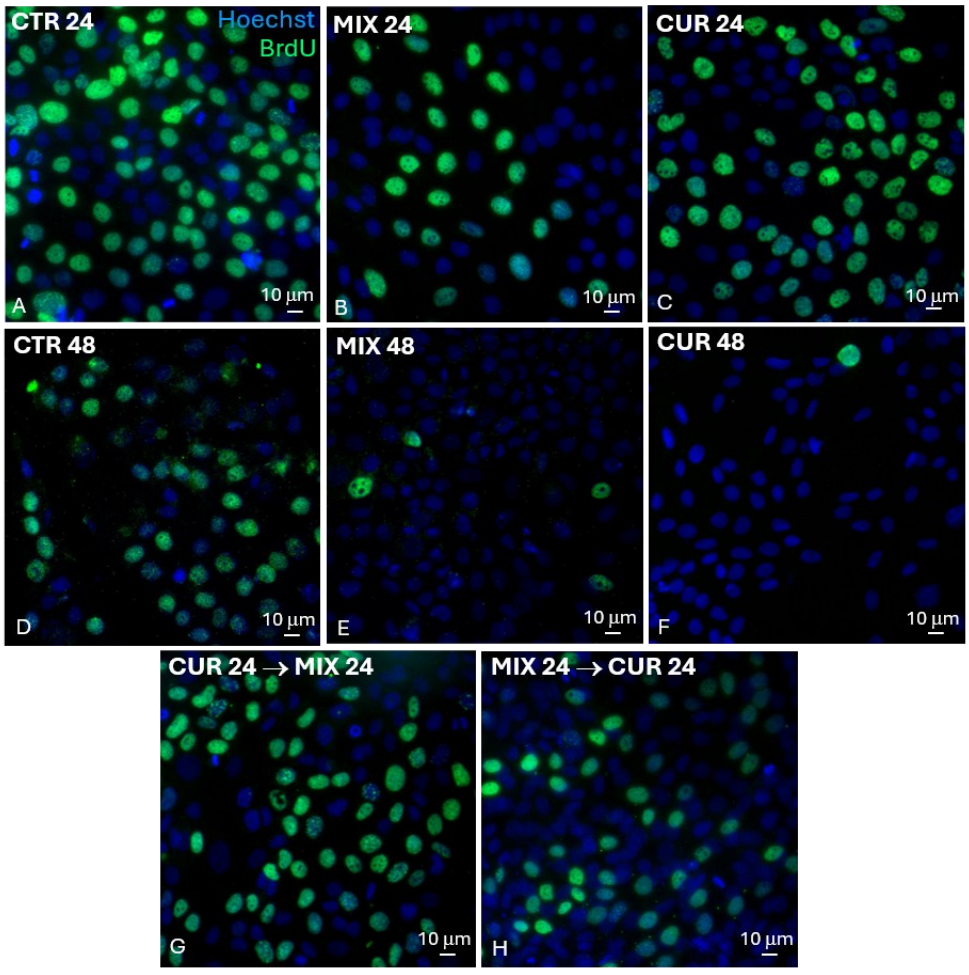
In seguito, sono state analizzate le risposte cellulari in termini di giunzioni cellulari occludenti, attività proliferativa e differenziamento.

3.1 Attività proliferativa

Per valutare il potenziale effetto del composto naturale *Curcuma caesia* Roxb. sull'attività proliferativa dei cheratinociti HaCaT differenziati è stato eseguito il saggio di incorporazione della Bromodesossiuridina (BrdU).

A 24h, la sostanza da sola (CUR 24h, Figura 25C) non sembra alterare la proliferazione, seguendo la condizione di controllo (CTR 24h, Figura 25A). Il trattamento isolato con la miscela citochinica (MIX 24h; Figura 25B) provoca un calo dell'attività proliferativa; tuttavia, il pretrattamento (CUR 24h → MIX 24h; Figura 25G), mostra una tendenza opposta significativa ($p < 0,05$).

A 48h, i trattamenti singoli con la curcuma (CUR 48h; Figura 25F) e con il MIX (MIX 48h; Figura 25E) mostrano un calo della proliferazione ($p < 0,05$) rispetto al controllo di riferimento (CTR 48h; Figura 25D). Al contrario, nel post-trattamento (MIX 24h → CUR 24h; Figura 25H), l'aggiunta successiva del composto sembra indurre una ripresa dell'attività proliferativa, con livelli significativamente superiori rispetto al MIX 48h ($p < 0,01$) e comparabili al controllo a pari tempo (CTR 48h). Tra le due diverse sequenze cronologiche di trattamento combinato non sono emerse differenze significative.



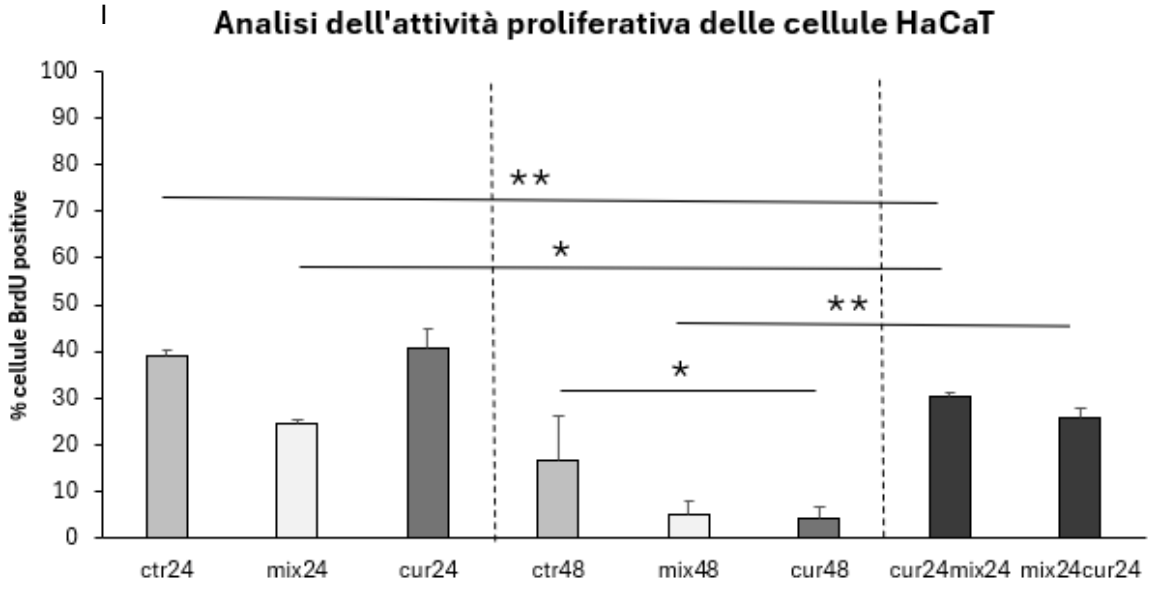


Figura 25: ***Analisi dell'attività delle cellule HaCaT differenziate e trattate con Curcuma caesia Roxb****. Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza (Zeiss Axiophot) relative all'immunomarcatura per BrdU in cellule di controllo (A e D), trattate con miscela di citochine psoriasiche (B e E), trattate con la sola sostanza naturale (C e F), campioni pretrattati con curcuma e poi esposti al MIX (G), campioni esposti al MIX e post-trattati con curcuma (H). I nuclei cellulari in attiva fase di sintesi del DNA sono marcati in verde (BrdU positivi), mentre i nuclei totali sono controcolorati con Hoechst 33258. (I) Valutazione quantitativa della percentuale di cellule BrdU-positive rispetto al numero totale di cellule nei rispettivi time-point e condizioni sperimentali. I dati sono espressi come media ± deviazione standard (SD). La significatività statistica tra i gruppi è espressa come p<0,05 (*) e p<0,01 (**).*

3.2 Giunzioni cellulari occludenti *(TJs)*

L'analisi in immunofluorescenza della proteina Claudina-1 (CLDN-1) ha evidenziato alcune variazioni nell'espressione e nella distribuzione del segnale tra le diverse condizioni sperimentali considerate.

Nei cheratinociti esposti al trattamento con curcuma blu per 24 e 48h (Figura 26C e 26F), il segnale fluorescente si mantiene espresso, mostrando una distribuzione sovrapponibile alle condizioni basali di riferimento (Figura 26A e 26D). L'introduzione dello stimolo citochinico proinfiammatorio MIX determina una riduzione dell'intensità di fluorescenza sia a 24h sia a 48h (Figura 26B e 26E); diversamente, nei campioni esposti ai trattamenti combinati si osserva un andamento opposto, ovvero sia nel pretrattamento (CUR24h → MIX 24h; Figura 26G) sia nel post-trattamento (MIX 24h → CUR24h; Figura 26H), si riscontra un aumento del segnale fluorescente rispetto alla condizione di solo MIX.

Queste osservazioni, sebbene di natura preliminare, suggeriscono un possibile mantenimento del segnale di CLDN-1 in presenza del trattamento con *Curcuma caesia* Roxb.

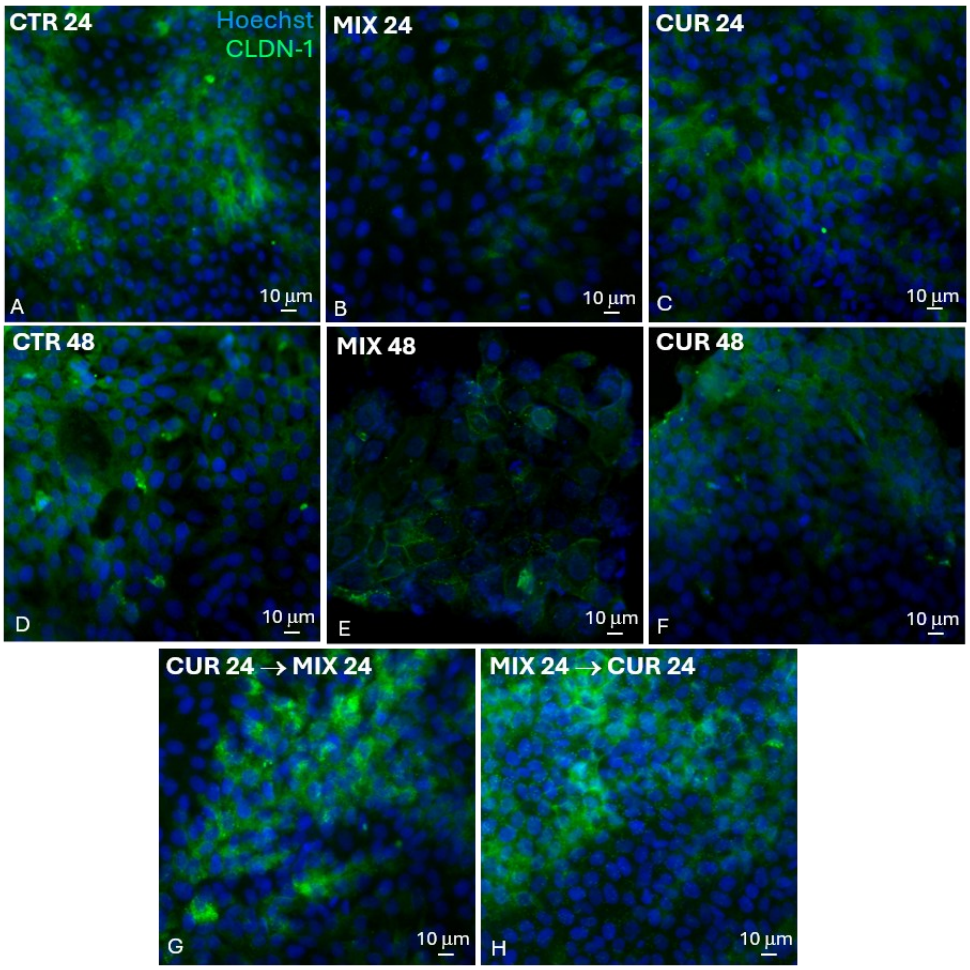


Figura 26: ***Analisi in immunofluorescenza dell'espressione e della localizzazione cellulare di Claudina-1 (CLDN-1) in cheratinociti HaCaT trattati con Curcuma caesia Roxb.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per CLDN-1 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT indotte al differenziamento, analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza del MIX psoriasico o in seguito a trattamenti combinati. I nuclei sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule esposte al MIX citochinico per 24h; (C) Cellule trattate direttamente con curcuma per 24h (CUR24h); (D) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (E) Cellule esposte al MIX citochinico per 48h; (H) Campioni sottoposti a post-trattamento, esposti al MIX per 24h e successivamente al composto naturale per 24h (MIX 24h→CUR24h); (F) Cellule trattate direttamente con curcuma per 48h (CUR48h); (G) Campioni sottoposti a pretrattamento con curcuma per 24h e successiva esposizione al MIX per 24h (CUR24h →MIX 24h). Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 µm]*

3.3 Differenziamento

Nei campioni di cellule HaCaT differenziate ed esposte al trattamento isolato con la curcuma blu per 24h (Figura 27C), la citocheratina 10 (K10) mantiene una distribuzione e un'intensità di fluorescenza paragonabile a quella riscontrata nel rispettivo controllo (Figura 27A). Allo stesso modo, i campioni trattati per 48h (Figura 27F) mostrano livelli di espressione sovrapponibili a quelli del relativo controllo al medesimo *time point* (Figura 27D).

Se l'esposizione alla miscela proinfiammatoria psoriasica determina una riduzione del segnale fluorescente sia a 24h sia a 48h (figura 27B e 27E), nei campioni trattati in maniera combinata si osserva un andamento inverso. Sia nel pretrattamento (CUR 24h → MIX 24h; Figura 27G) sia nel post-trattamento (MIX 24h → CUR 24h; Figura 27H), emerge un aumento del segnale relativo alla proteina K10 rispetto alla condizione di solo MIX.

Queste osservazioni, sebbene derivino da una preliminare fase di studio, indicano che l'estratto di *Curcuma caesia* Roxb. potrebbe attenuare la riduzione del segnale di K10 indotta dal microambiente psoriasico.

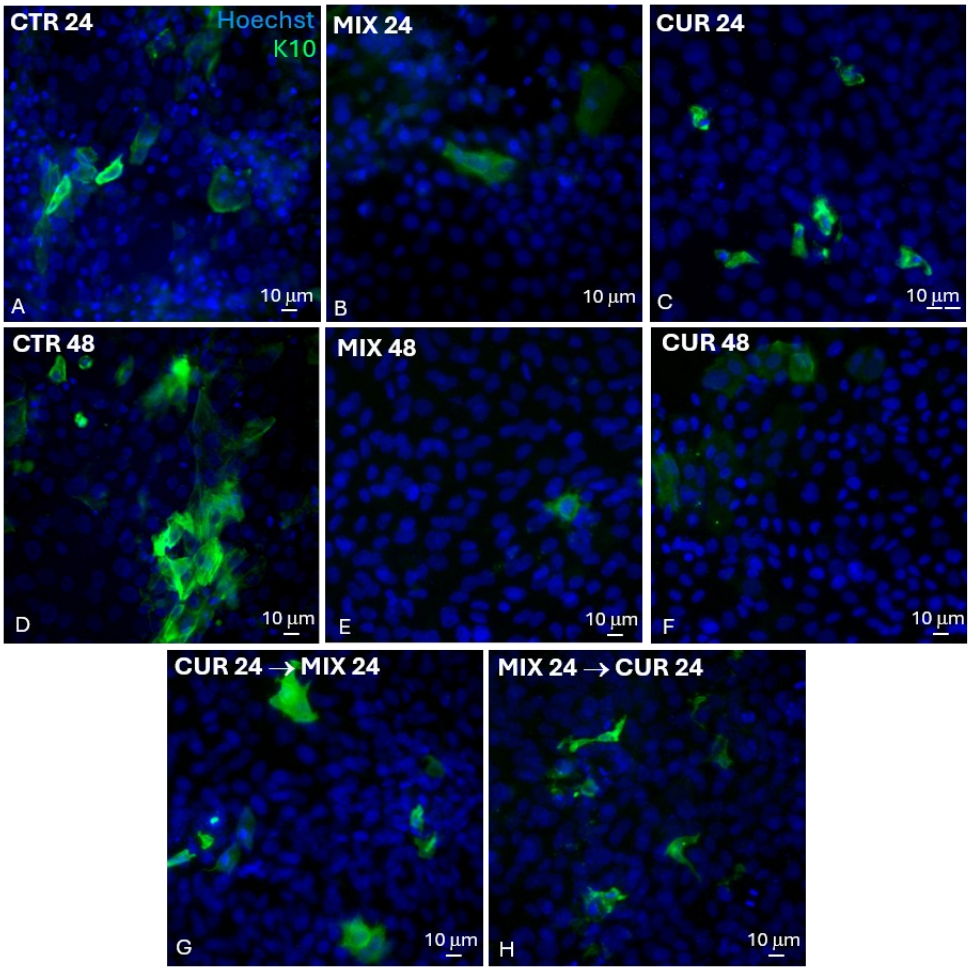


Figura 27: ***Analisi in immunofluorescenza dell'espressione e della localizzazione cellulare della citocheratina 10 (K10) in cheratinociti HaCaT trattati con Curcuma caesia Roxb.*** *Immagini rappresentative dell'immunomarcatura per K10 (fluorescenza verde, FITC) in cellule HaCaT indotte al differenziamento, analizzate a diversi intervalli di tempo in presenza o assenza del MIX psoriasico o in seguito a trattamenti combinati. I nuclei sono controcolorati in blu con Hoechst 33258. (A) Cellule di controllo non trattate, a 24h dal differenziamento; (B) Cellule esposte al MIX citochinico per 24h; (C) Cellule trattate direttamente con curcuma per 24h (CUR24h); (D) Cellule di controllo non trattate, a 48h dal differenziamento; (E) Cellule esposte al MIX citochinico per 48h; (H) Campioni sottoposti a post-trattamento, esposti al MIX per 24h e successivamente al composto naturale per 24h (MIX 24h→CUR24h); (F) Cellule trattate direttamente con curcuma per 48h (CUR48h); (G) Campioni sottoposti a pretrattamento con curcuma per 24h e successiva esposizione al MIX per 24h (CUR24h →MIX 24h). Le fotomicrografie sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Zeiss Axiophot. [Scale bar: 10 μm]*

DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un più ampio Progetto di ricerca (nato da una collaborazione tra la prof. Federica Riva dell'istituto di Istologia ed Embriologia dell'Università di Pavia e la prof. Elena Donetti del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università di Milano) relativo alla definizione di un modello cellulare bidimensionale di cheratinociti umani capace di mimare l'istoarchitettura dell'epidermide di cute umana in condizioni sane e anche in un ambiente infiammatorio, per valutarne gli effetti biologici associati ai processi di proliferazione, differenziamento e protezione epidermica.

Il modello sperimentale di linea cellulare HaCaT è costituito da cheratinociti umani immortalizzati spontaneamente e coltivati *in vitro*, indotti al differenziamento soprabasale mediante l'aggiunta al terreno di coltura di cloruro di calcio alla concentrazione di 1.8 mM, ed esposti ad una miscela di citochine proinfiammatorie psoriasiche. Sono state eseguite valutazioni qualitative, affiancate da analisi quantitative dell'intensità del segnale in immunofluorescenza, per confermare precedenti dati ottenuti nel nostro laboratorio e relativi all'effetto diretto e precoce dopo esposizione per 24h e 48h al *cocktail* di citochine psoriasiche (MIX). Lo studio è quindi proseguito con la valutazione dell'effetto biologico dovuto all'impiego di vescicole extracellulari (EVs) isolate dai terreni di coltura di cellule HaCaT esposte al trattamento per 24h e 48h con il MIX, rispetto alle vescicole isolate dalle cellule di controllo agli stessi *time points*.

L'analisi morfologica delle cellule HaCaT trattate con il MIX di citochine per 24h e 48h ore non ha rivelato evidenti variazioni nella forma delle cellule rispetto ai relativi controlli. Il saggio di incorporazione di bromodesossiuridina (BrdU) per la valutazione dell'attività proliferativa ha evidenziato una significativa riduzione della proliferazione cellulare in seguito al trattamento con la miscela di citochine, ad entrambe le tempistiche considerate. Il dato appare di notevole interesse poiché, diversamente dall'iperproliferazione caratteristica della patologia *in vivo*, lo stimolo infiammatorio precoce sembra esercitare un effetto inibitorio sulla proliferazione dei cheratinociti.

Per quanto riguarda l'effetto precoce del MIX psoriasico sulla barriera epidermica a livello di *Tight Junctions* è emersa una riduzione dell'intensità di fluorescenza della proteina Claudina-1 (CLDN-1), in seguito all'esposizione al *cocktail* di citochine. Le analisi relative a *Zonula Occludens*-1 (ZO-1), proteina citoplasmatica delle *Tight Junctions*, hanno registrato livelli di distribuzione sovrapponibili ai controlli, come confermato dall'analisi quantitativa della fluorescenza, che non rivela differenze significative tra i campioni ai vari tempi.

Il diverso comportamento dei due *markers* giunzionali suggerisce una precoce interferenza dello stimolo infiammatorio psoriasico con le componenti transmembrana delle giunzioni (Claudina-1), mantenendo pressoché intatta l'impalcatura interna (e quindi l'espressione di ZO-1).

Per valutare l'effetto biologico della miscela di citochine sul processo di differenziamento cheratinocitario è stata analizzata la localizzazione e distribuzione della citocheratina 10 (K10) nel nostro modello di cellule HaCaT differenziate. Il MIX psoriasico provoca una riduzione di K10 nelle cellule HaCaT trattate sia per 24h sia per 48h.

L'effetto delle microvescicole derivate dalle colture cellulari esposte all'ambiente psoriasico è risultato coincidente con gli andamenti osservati nelle cellule a diretto contatto con l'ambiente proinfiammatorio patologico. L'esposizione alle vescicole derivanti dai campioni esposti al MIX non ha indotto alterazioni morfologiche cellulari evidenti rispetto ai controlli. Il saggio relativo all'attività proliferativa ha mostrato un calo della percentuale di cellule BrdU-positive nei campioni esposti a vescicole isolate dal MIX (EVs MIX 24h e EVs MIX 48h), risultata statisticamente significativa alle 24h, dati confermati anche da un primo approccio di analisi in citometria a flusso. Diversamente, i campioni trattati con le vescicole derivate dalle cellule di controllo (EVs CTR 24h e 48h) presentano livelli di proliferazione comparabili ai rispettivi controlli (CTR 24h e 48h).

Per quanto riguarda l'analisi delle giunzioni intercellulari TJs, nelle cellule HaCaT esposte alle EVs MIX è stata osservata una riduzione di CLDN-1, seppur senza differenze significative. Diversamente, ZO-1 ha mantenuto livelli di fluorescenza e organizzazione stabili e inalterati in tutte le condizioni sperimentali.

È stato osservato che le EVs psoriasiche hanno indotto una riduzione (seppur non statisticamente significativa) del *marker* di differenziamento K10 rispetto alle EVs derivanti dal controllo ad entrambi i tempi di 24h e 48h.

Complessivamente, questi dati dimostrano che il trattamento con vescicole extracellulari derivate da un microambiente stimolato con la miscela di citochine psoriasiche determina nelle cellule HaCaT differenziate un'azione biologica analoga a quella indotta direttamente dal MIX. Pertanto, è plausibile ipotizzare che le EVs possano agire come vettori di segnali biologici del microambiente psoriasico, modulando l'attività replicativa, l'integrità dei sistemi di giunzione e il differenziamento dei cheratinociti sani mediante un meccanismo di amplificazione a cascata.

In parallelo, il modello cellulare HaCaT di cheratinociti umani indotti al differenziamento soprabasale epidermico ed esposti al microambiente psoriasico è stato testato come modello 2D ottimale per la valutazione preliminare del potenziale ruolo biologico protettivo o terapeutico, di sostanze biogene anti-infiammatorie, come l'estratto naturale di *Curcuma caesia Roxb.*

I dati derivati dal saggio di incorporazione della BrdU evidenziano che la sola curcuma dopo 24 ore (CUR24h) non altera l'attività replicativa dei cheratinociti, mostrando un livello sovrapponibile a quello del controllo basale. L'induzione del pretrattamento con curcuma per 24h seguita dal MIX per altre 24h (CUR24h → MIX 24h) provoca un incremento statisticamente significativo della percentuale delle cellule in fase S del ciclo cellulare, contrastando l'effetto inibitorio del solo MIX. Al *time point* di 48h, l'esposizione al MIX e al solo estratto naturale (CUR48h) mostra una riduzione della proliferazione rispetto al controllo. Il post-trattamento con curcuma per 24h, dopo l'esposizione al MIX per 24h (Mix 24 → CUR24), evidenzia una ripresa significativa dell'attività proliferativa rispetto agli effetti dovuti al solo MIX 48h. I valori registrati nel post-trattamento sono risultati comparabili a quelli del controllo a parità di tempo (CTR 48h), suggerendo una potenziale capacità dell'estratto di curcuma di mitigare il blocco replicativo indotto dal microambiente psoriasico.

L'esposizione diretta al composto naturale non sembra modificare la distribuzione transmembrana di CLDN-1 rispetto alle condizioni di controllo. Nei trattamenti combinati (CUR24h → MIX 24h e MIX 24h → CUR24h), l'analisi qualitativa evidenzia una parziale attenuazione degli effetti indotti dal MIX, mostrando un aumento del segnale fluorescente della proteina.

Un andamento sovrapponibile è emerso dalla valutazione di K10. Il segnale relativo alla proteina nei campioni esposti alla sola *Curcuma caesia Roxb.* a 24h e 48h si mantiene simile a quello osservato nei rispettivi controlli. Entrambi i trattamenti sequenziali mostrano un parziale ripristino del segnale citoplasmatico rispetto alla riduzione provocata dal trattamento con la miscela psoriasica.

In conclusione, sebbene derivino da una fase di indagine preliminare e qualitativa condotta *in vitro*, i risultati complessivi suggeriscono che l'estratto naturale di *Curcuma caesia Roxb.* possa modulare parzialmente gli effetti di risposta cellulare causati dallo stimolo psoriasico.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nel presente lavoro di tesi è stato valutato l'effetto biologico precoce su cheratinociti umani differenziati (cellule HaCaT) esercitato da un microambiente psoriasico, mimato *in vitro* mediante una miscela di citochine proinfiammatorie (MIX) e tramite vescicole extracellulari (EVs) da esso derivate. Sono stati considerati alcuni marcatori associati alla proliferazione (BrdU), ai sistemi giunzionali (CLDN-1 e ZO-1) e allo stato differenziativo soprabasale (K10). Sono state condotte osservazioni in immunofluorescenza corredate da analisi quantitative dell'intensità di segnale. Inoltre, il modello sperimentale differenziato è stato impiegato per una valutazione preliminare del potenziale ruolo protettivo o terapeutico dell'estratto naturale di *Curcuma caesia Roxb.* in un contesto di danno indotto dal microambiente psoriasico.

I risultati finora ottenuti dal trattamento diretto con il MIX di citochine e dall'esposizione alle vescicole extracellulari patologiche (EVs Mix) mostrano un quadro di precoce alterazione dell'omeostasi cellulare. Essi mostrano come il microambiente psoriasico possa indurre un rallentamento dell'attività proliferativa dei cheratinociti e del loro programma differenziativo, con indebolimento delle *Tight Junctions* (CLDN-1) e modulazione di K10. Diversamente, la proteina di *scaffold* ZO-1 si è dimostrata stabile nei confronti dello stimolo infiammatorio.

Le vescicole extracellulari sembrano agire come mediatori del microambiente psoriasico. Le EVs provenienti dai terreni di coltura di cellule trattate con il MIX trasmettono segnali di attenuazione dell'attività proliferativa e favoriscono alterazioni strutturali coerenti con la fisiopatologia psoriasica, a livello differenziativo e giunzionale.

Questi dati forniscono un quadro in cui citochine infiammatorie e vescicole extracellulari concorrono in tempi precoci a determinare nei cheratinociti un profilo meno proliferativo e differenziato.

Infine, è stata valutata l'esposizione all'estratto naturale di *Curcuma caesia Roxb,* un tubero avente proprietà anti-infiammatorie. Dalle analisi è emerso un recupero dell'attività proliferativa dei cheratinociti sia pretrattati sia post-trattati rispetto al MIX. In modo analogo, le osservazioni qualitative mostrano una parziale attenuazione della downregolazione dei *marker* strutturali e differenziativi CLDN-1 e K10 dovuta all'esposizione ad un ambiente psoriasico, facendo ipotizzare una capacità dell'estratto vegetale di mitigare precocemente il danno infiammatorio.

Le prospettive future saranno rivolte ad ampliare la statistica ripetendo gli esperimenti condotti in via preliminare, al fine di validare i dati ottenuti sia dalle osservazioni qualitative in microscopia, sia dalle analisi quantitative finora registrate, e verificare i *trend* emersi, per quanto riguarda il modello differenziato e le vescicole extracellulari, di cui sarà anche necessario valutarne il *cargo* molecolare.

Si prevedono analisi mediante citometria a flusso e Western Blot sulle colture cheratinocitarie, per affiancare all'immunofluorescenza una quantificazione di specifici parametri e marcatori cellulari, estendendo la valutazione sia nel modello differenziato diretto, sia nei campioni esposti alle vescicole extracellulari del controllo e derivanti dalle cellule in ambiente psoriasico.

Allo stesso modo, per lo studio relativo alla *Curcuma caesia Roxb.* sarà necessario ripetere gli esperimenti per raccogliere una casistica solida che consenta, successivamente, di effettuare un'analisi quantitativa e statistica dei livelli di espressione dei marcatori giunzionali e di differenziamento, così da validare il potenziale effetto biologico dell'estratto naturale.

Un altro interessante filone di indagine potrà riguardare processi di morte cellulare indotti dall'ambiente proinfiammatorio psoriasico, quali apoptosi, fagocitosi e ferroptosi.

Ulteriori studi potranno considerare una cinetica più breve di esposizione delle cellule HaCaT al MIX psoriasico, per una analisi ancor più precoce dell'effetto biologico delle citochine proinfiammatorie sulle proprietà di barriera e di *turnover* dell'epidermide. Sono già state avviate anche indagini per meglio definire ed ottimizzare il modello cellulare *in vitro*, aumentando le tempistiche di differenziamento, per mimare anche gli strati differenziati più superficiali dell'epidermide.

BIBLIOGRAFIA

1. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. Int J Mol Sci. 7 giugno 2013;14(6):12222–48. doi:10.3390/ijms140612222

2. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. Oncogene. 13 gennaio 2011;30(2):127–38. doi:10.1038/onc.2010.456

3. Marrapodi R, Bellei B. The Keratinocyte in the Picture Cutaneous Melanoma Microenvironment. Cancers. 23 febbraio 2024;16(5):913. doi:10.3390/cancers16050913

4. Roth W, Hatzfeld M, Friedrich M, Thiering S, Magin TM. Keratin function and regulation in tissue homeostasis and pathogenesis. Biomol Concepts. 1 aprile 2012;3(2):161–73. doi:10.1515/bmc.2011.060

5. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. Exp Dermatol. febbraio 2016;25(2):92–8. doi:10.1111/exd.12832

6. Riva F, Gammella E, Correnti M, Daluiso D, Prignano F, Recalcati S, et al. A Proinflammatory Psoriatic Microenvironment Has Early Effects on Keratinocyte Proliferation/Differentiation and Induces Ferroptosis in HaCaT Cells. Biology. 21 febbraio 2026;15(4):362. doi:10.3390/biology15040362

7. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, H□rin M, Coquette A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. Arch Dermatol Res. ottobre 2004;296(5):203–11. doi:10.1007/s00403-004-0507-y

8. Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. Nat Med. agosto 2014;20(8):847–56. doi:10.1038/nm.3643

9. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. Semin Cell Dev Biol. dicembre 2014;36:157–65. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.011

10. Capaldo CT. Claudin Barriers on the Brink: How Conflicting Tissue and Cellular Priorities Drive IBD Pathogenesis. Int J Mol Sci. 10 maggio 2023;24(10):8562. doi:10.3390/ijms24108562

11. Volksdorf T, Heilmann J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M, Ueck C, et al. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. Am J Pathol. giugno 2017;187(6):1301–12. doi:10.1016/j.ajpath.2017.02.006

12. Kirschner N, Poetzl C, Von Den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, et al. Alteration of Tight Junction Proteins Is an Early Event in Psoriasis. Am J Pathol. settembre 2009;175(3):1095–106. doi:10.2353/ajpath.2009.080973

13. Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. Cytotechnology. 26 luglio 2007;54(2):77–83. doi:10.1007/s10616-007-9076-1

14. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J Cell Biol. 1 marzo 1988;106(3):761–71. doi:10.1083/jcb.106.3.761

15. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. Mediators Inflamm. 2017;2017:1–12. doi:10.1155/2017/7435621

16. Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. Exp Dermatol. febbraio 2009;18(2):143–51. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x

17. Peng W, Zhao Y, Ren B, He T, Li D, Zhang H, et al. Construction of a 3D bioprinted skin model for psoriasis research and drug evaluation. Biofabrication. 1 ottobre 2025;17(4):045012. doi:10.1088/1758-5090/adfe1d

18. Donetti E, Lombardo G, Baruffaldi Preis F, Cornaghi L, Pescitelli L, Prignano F. 3D skin model to investigate the early epidermal morphological psoriatic features. J Transl Sci. 2020;6(4). doi:10.15761/JTS.1000361

19. Donetti E, Riva F, Indino S, Lombardo G, Baruffaldi Preis F, Rosi E, et al. Th2 Cytokines Affect the Innate Immune Barrier without Impairing the Physical Barrier in a 3D Model of Normal Human Skin. J Clin Med. 1 marzo 2023;12(5):1941. doi:10.3390/jcm12051941

20. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. N Engl J Med. 30 luglio 2009;361(5):496–509. doi:10.1056/NEJMra0804595

21. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. The Lancet. aprile 2021;397(10281):1301–15. doi:10.1016/S0140-6736(20)32549-6

22. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. Int J Mol Sci. 23 marzo 2019;20(6):1475. doi:10.3390/ijms20061475

23. Furue M, Furue K, Tsuji G, Nakahara T. Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis. Int J Mol Sci. 13 febbraio 2020;21(4):1275. doi:10.3390/ijms21041275

24. Zhou X, Chen Y, Cui L, Shi Y, Guo C. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. Cell Death Dis. 24 gennaio 2022;13(1):81. doi:10.1038/s41419-022-04523-3

25. Orsmond A, Bereza-Malcolm L, Lynch T, March L, Xue M. Skin Barrier Dysregulation in Psoriasis. Int J Mol Sci. 7 ottobre 2021;22(19):10841. doi:10.3390/ijms221910841

26. Abdo AIK, Tye GJ. Interleukin 23 and autoimmune diseases: current and possible future therapies. Inflamm Res. maggio 2020;69(5):463–80. doi:10.1007/s00011-020-01339-9

27. Yamanaka K, Yamamoto O, Honda T. Pathophysiology of psoriasis: A review. J Dermatol. giugno 2021;48(6):722–31. doi:10.1111/1346-8138.15913

28. Chiricozzi A, Romanelli M, Panduri S, Donetti E, Prignano F. Relevance of in vitro 3-D skin models in dissecting cytokine contribution to psoriasis pathogenesis. Histol Histopathol. giugno 2017;(32):893–8. doi:10.14670/HH-11-877

29. Shou Y, Yang L, Yang Y, Xu J. Inhibition of keratinocyte ferroptosis suppresses psoriatic inflammation. Cell Death Dis. 27 ottobre 2021;12(11):1009. doi:10.1038/s41419-021-04284-5

30. Kastelan M, Prpić-Massari L, Brajac I. Apoptosis in psoriasis. Acta Dermatovenerol Croat ADC. 2009;17(3):182–6. PubMed PMID: 19818217.

31. Duan X, Liu X, Liu N, Huang Y, Jin Z, Zhang S, et al. Inhibition of keratinocyte necroptosis mediated by RIPK1/RIPK3/MLKL provides a protective effect against psoriatic inflammation. Cell Death Dis. 19 febbraio 2020;11(2):134. doi:10.1038/s41419-020-2328-0

32. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. Cell. maggio 2012;149(5):1060–72. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042

33. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. Cell Death Dis. 3 febbraio 2020;11(2):88. doi:10.1038/s41419-020-2298-2

34. Lei X, Ring S, Jin S, Singh S, Mahnke K. Extracellular Vesicles and Their Role in Skin Inflammatory Diseases: From Pathogenesis to Therapy. Int J Mol Sci. 18 aprile 2025;26(8):3827. doi:10.3390/ijms26083827

35. Capriotti L, Iuliano M, Lande R, Frasca L, Falchi M, Rosa P, et al. Potential Pathogenetic Role of Antimicrobial Peptides Carried by Extracellular Vesicles in an in vitro Psoriatic Model. J Inflamm Res. settembre 2022;Volume 15:5387–99. doi:10.2147/JIR.S373150

36. Shao S, Fang H, Li Q, Wang G. Extracellular vesicles in Inflammatory Skin Disorders: from Pathophysiology to Treatment. Theranostics. 2020;10(22):9937–55. doi:10.7150/thno.45488

37. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. J Extracell Vesicles. febbraio 2024;13(2):e12404. doi:10.1002/jev2.12404

38. Tang B, Bi Y, Zheng X, Yang Y, Huang X, Yang K, et al. The Role of Extracellular Vesicles in the Development and Treatment of Psoriasis: Narrative Review. Pharmaceutics. 12 dicembre 2024;16(12):1586. doi:10.3390/pharmaceutics16121586

39. Lima MJT, Januzzi LLR, Gameiro J. Plasma-Derived Extracellular Vesicles as Biomarkers and Modulators in Human Disease. Bratisl Med J. 8 novembre 2025;126(12):3277–89. doi:10.1007/s44411-025-00410-3

40. Born LJ, Khachemoune A. Extracellular vesicles: a comprehensive review of their roles as biomarkers and potential therapeutics in psoriasis and psoriatic arthritis. Clin Exp Dermatol. 22 marzo 2023;48(4):310–8. doi:10.1093/ced/llac108

41. Qi F, Jin H. Extracellular vesicles from keratinocytes and other skin-related cells in psoriasis: A review. Exp Dermatol. gennaio 2024;33(1):e15001. doi:10.1111/exd.15001

42. Hewlings S, Kalman D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. Foods. 22 ottobre 2017;6(10):92. doi:10.3390/foods6100092

43. Yin Y, Xie X, Zhou L, Yin X, Guo S, Zhou X, et al. A chromosome-scale genome assembly of turmeric provides insights into curcumin biosynthesis and tuber formation mechanism. Front Plant Sci. 26 settembre 2022;13:1003835. doi:10.3389/fpls.2022.1003835

44. Sanlier NT, Sacinti KG, Turkoglu İ, Sanlier N. From bench to bedside: unlocking the anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer promise of curcumin in gynecology. Front Med. 20 febbraio 2026;13:1761721. doi:10.3389/fmed.2026.1761721

45. Dosoky NS, Setzer WN. Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Curcuma Species. Nutrients. 1 settembre 2018;10(9):1196. doi:10.3390/nu10091196

46. Leela NK, Adheeba PK. Curcuma caesia Roxb. - Update of phytochemicals and pharmacological properties: Phytochemical properties of Curcuma caesia. J Spices Aromat Crops. 12 settembre 2024;1–22. doi:10.25081/josac.2024.v33.i1.8477

47. Biswas A, Boruah JLH, Mridha P, Baishya R. Phytochemical Profiling and Mechanistic Evaluation of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of *Curcuma caesia* Roxb. Rhizome Extract: An Integrated In Vitro, In Vivo, and In Silico Study. Chem Biodivers. marzo 2026;23(3):e02056. doi:10.1002/cbdv.202502056

48. Burattini S, Gianfanti F, Onesimo F, Zeppa SD, Canonico B, Montanari M, et al. Blue elixir of youth and wellness: The multicomponent-multitarget paradigm of Curcuma caesia Roxb. J Funct Foods. febbraio 2025;125:106699. doi:10.1016/j.jff.2025.106699

49. Brandner J, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck L, De Benedetto A. Epidermal tight junctions in health and disease. Tissue Barriers. 3 aprile 2015;3(1–2):e974451. doi:10.4161/21688370.2014.974451

50. Sieminska I, Pieniawska M, Grzywa TM. The Immunology of Psoriasis—Current Concepts in Pathogenesis. Clin Rev Allergy Immunol. 20 aprile 2024;66(2):164–91. doi:10.1007/s12016-024-08991-7

51. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 Axis in the Immunopathogenesis of Psoriasis. J Invest Dermatol. giugno 2009;129(6):1339–50. doi:10.1038/jid.2009.59

52. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. J Clin Invest. 16 novembre 2009;JCI40202. doi:10.1172/JCI40202

53. Kim EJ, Park HS, Yoon HS, Cho S. A Case of Psoriasis Accompanied by Systemic Lupus Erythematosus. Ann Dermatol. 2015;27(3):347. doi:10.5021/ad.2015.27.3.347

54. Grine L, Dejager L, Libert C, Vandenbroucke RE. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. Cytokine Growth Factor Rev. febbraio 2015;26(1):25–33. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.10.009

55. Man AM, Orăsan MS, Hoteiuc OA, Olănescu-Vaida-Voevod MC, Mocan T. Inflammation and Psoriasis: A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 8 novembre 2023;24(22):16095. doi:10.3390/ijms242216095

56. Todorović V, McDonald HA, Hoover P, Wetter JB, Marinopoulos AE, Woody CL, et al. Cytokine induced 3-D organotypic psoriasis skin model demonstrates distinct roles for NF-κB and JAK pathways in disease pathophysiology. Exp Dermatol. luglio 2022;31(7):1036–47. doi:10.1111/exd.14551

57. Rabeony H, Petit-Paris I, Garnier J, Barrault C, Pedretti N, Guilloteau K, et al. Inhibition of Keratinocyte Differentiation by the Synergistic Effect of IL-17A, IL-22, IL-1α, TNFα and Oncostatin M. Simon M, curatore. PLoS ONE. 10 luglio 2014;9(7):e101937. doi:10.1371/journal.pone.0101937

58. Bocheńska K, Moskot M, Gabig-Cimińska M. Use of Cytokine Mix-, Imiquimod-, and Serum-Induced Monoculture and Lipopolysaccharide- and Interferon Gamma-Treated Co-Culture to Establish In Vitro Psoriasis-like Inflammation Models. Cells. 2 novembre 2021;10(11):2985. doi:10.3390/cells10112985

59. Donetti E, Cornaghi L, Gualerzi A, Baruffaldi Preis FW, Prignano F. An innovative three-dimensional model of normal human skin to study the proinflammatory psoriatic effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-17. Cytokine. luglio 2014;68(1):1–8. doi:10.1016/j.cyto.2014.03.003

60. Donetti E, Cornaghi L, Arnaboldi F, Ricceri F, Pescitelli L, Maiocchi M, et al. Epidermal barrier reaction to an in vitro psoriatic microenvironment. Exp Cell Res. novembre 2017;360(2):180–8. doi:10.1016/j.yexcr.2017.09.004

61. Donetti E, Lombardo G, Indino S, Cornaghi L, Arnaboldi F, Pescitelli L, et al. The psoriatic shift induced by interleukin 17 is promptly reverted by a specific anti-IL-17A agent in a three-dimensional organotypic model of normal human skin culture. Eur J Histochem. 16 aprile 2020;64(2). doi:10.4081/ejh.2020.3115

62. Prignano F, Donetti E. Looking at Interleukin-22 from a New Dermatological Perspective: From Epidermal Homeostasis to Its Role in Chronic Skin Diseases. Dermatology. 2022;238(5):829–36. doi:10.1159/000524119

63. Dey-Rao R, Melendy T. HaCaT Keratinocytes: A Differentiation-Competent Platform for Episomal Replication of HPV Type 11. Viruses. 12 febbraio 2026;18(2):230. doi:10.3390/v18020230

64. Jiang M, Fang H, Dang E, Zhang J, Qiao P, Yu C, et al. Small Extracellular Vesicles Containing miR-381-3p from Keratinocytes Promote T Helper Type 1 and T Helper Type 17 Polarization in Psoriasis. J Invest Dermatol. marzo 2021;141(3):563–74. doi:10.1016/j.jid.2020.07.009

65. Zhang B, Wu F. Proteomic identification of exosomes derived from psoriasis cells using data-independent acquisition mass spectrometry. Arch Dermatol Res. 24 maggio 2024;316(6):224. doi:10.1007/s00403-024-02984-4

66. Mangino G, Iuliano M, Carlomagno S, Bernardini N, Rosa P, Chiantore MV, et al. Interleukin-17A affects extracellular vesicles release and cargo in human keratinocytes. Exp Dermatol. settembre 2019;28(9):1066–73. doi:10.1111/exd.14015

67. Jiang M, Fang H, Shao S, Dang E, Zhang J, Qiao P, et al. Keratinocyte exosomes activate neutrophils and enhance skin inflammation in psoriasis. FASEB J. dicembre 2019;33(12):13241–53. doi:10.1096/fj.201900642R

68. Zhao Y, Sun J, Dou W, Hu JH. Curcumin inhibits proliferation of interleukin-22-treated HaCaT cells. Int J Clin Exp Med. 2015;8(6):9580–4. PubMed PMID: 26309628; PubMed Central PMCID: PMC4537989.

69. Varma SR, Sivaprakasam TO, Mishra A, Prabhu S, M R, P R. Imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: Its evaluation using curcumin. Eur J Pharmacol. ottobre 2017;813:33–41. doi:10.1016/j.ejphar.2017.07.040

70. Zhang S, Wang J, Liu L, Sun X, Zhou Y, Chen S, et al. Efficacy and safety of curcumin in psoriasis: preclinical and clinical evidence and possible mechanisms. Front Pharmacol. 29 agosto 2022;13:903160. doi:10.3389/fphar.2022.903160

71. AgouTii A, Ahmed Mostefai H, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, et al. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. FASEB J. settembre 2007;21(11):2735–41. doi:10.1096/fj.07-8079com

72. Seo MD, Kang TJ, Lee CH, Lee AY, Noh MS. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. Biomol Ther. 31 marzo 2012;20(2):171–6. doi:10.4062/biomolther.2012.20.2.171

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la mia relatrice, la ***Prof.ssa Riva***, per avermi dato la possibilità di proseguire il mio percorso all'interno del suo laboratorio dopo l'esperienza della tesi triennale, inserendomi in un ampio progetto di ricerca interessante e stimolante. La ringrazio per la fiducia rinnovata e per il supporto fondamentale che mi ha offerto in tutto il periodo di internato di tesi e durante la stesura di questo lavoro.

Ringrazio inoltre la ***Prof.ssa Donetti*** e la ***Prof.ssa Gammella*** dell'Università degli Studi di Milano, per le analisi di Western blot e per avermi permesso di partecipare con il mio studio al progetto di ricerca in collaborazione con la Prof.ssa Riva

Un ringraziamento è rivolto anche alla ***Prof.ssa Porro*** dell'Università di Foggia per l'isolamento delle vescicole extracellulari (EVs) impiegate nello studio.

Ringrazio la ***Prof.ssa Battistelli*** dell'Università di Urbino per l'allestimento dei campioni di *Curcuma caesia*.

Desidero inoltre ringraziare il ***Prof. Mazzini*** per aver guidato l'analisi dei campioni in citometria a flusso.