

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

CORSO INTEGRATO DI PATOLOGIA GENERALE ED ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE E LABORATORIO

MODULO DI PATOLOGIA GENERALE

Prof.P-Laccetti / A. Porcellini

PROGRAMMA D'ESAME

ETIOLOGIA GENERALE.

Concetto di salute, di stato morboso e di malattia.

Principali categorie di agenti tossici. Cause di danno cellulare e di malattia. Agenti eziologici (Agenti fisici, chimici e biologici).

Danno da agenti fisici : Radiazioni ionizzanti, Radiazioni ultraviolette, Campi elettromagnetici. Temperature: Ustioni, Congelamento.

Danno da agenti chimici (Agenti chimici inorganici ed organici). Sostanze flogogene e steatogene.

L'alimentazione come causa di malattia; Meccanismi di detossificazione o attivazione degli xenobiotici.

Elementi di patologia ambientale ed occupazionale.

Cenni di danno da agenti biologici. ed effetti biologici prodotti. Danni al DNA

PATOLOGIA GENETICA E CELLULARE

Richiami di struttura, morfologia e funzioni primarie della cellula. Richiami di comunicazione tra le cellule. Processi degenerativi cellulari ed extracellulari. Alterazioni degli organuli citoplasmatici e delle membrane. Le principali cause di danno cellulare (Ipossia, agenti chimici, agenti fisici, agenti infettivi, reazioni immunologiche, aberrazioni genetiche etc.).

Alterazioni cromosomiche; Alterazioni del numero dei cromosomi; Principali aberrazioni cromosomiche; Tipi di mutazioni; Patogenesi delle malattie monogeniche; Metodi di studio delle malattie genetiche (analisi cromosomica, genica e proteomica).

ADATTAMENTI CELLULARI

Processi di adattamento cellulare ed anomalie della crescita cellulare (Aplasia, Ipoplasia, Atrofia, Ipofrofia, Iperprofia, Iperplasia, Metaplasia).

I meccanismi molecolari del danno cellulare. Stress ossidativo: origine dei radicali liberi, perossidazione lipidica, ossidazione di proteine e DNA; Difese antiossidanti della cellula; Il danno ipossico.

Degenerazioni cellulari: rigonfiamento torbido e degenerazione idropica; degenerazione vacuolare; accumuli intracellulari; steatosi.

La morte cellulare (Invecchiamento, Apoptosi, Necrosi). Cause e meccanismi molecolari.

Apoptosi: Cause di apoptosi; Aspetti morfologici, biochimici e molecolari; geni, vie di attivazione, cascata delle caspasi, sistemi di controllo e regolazione; sistema recettoriale e sistema mitocondriale. Relazione fra apoptosi e cancro.

Elementi distintivi rispetto alla morte cellulare per necrosi.

Necrosi: Patogenesi, eventi cellulari ed evoluzione della necrosi; Tipi di necrosi: semplice, coagulativa, colliquativa. Gangrene: secca, umida, gassosa.

PATOLOGIA DELLO SPAZIO EXTRACELLULARE

Amiloidosi. Calcificazioni patologiche. Fibrosi localizzate e sistemiche.

ONCOLOGIA

Definizione di neoplasia

Il ciclo cellulare: Fasi, meccanismi di regolazione ed alterazione del ciclo cellulare.. Cicline, chinasi ciclino-dipendenti, MPF, inibitori del ciclo cellulare.

Proliferazione e differenziazione cellulare normale. Processi di adattamento cellulare ed anomalie della crescita cellulare (Metaplasia, Displasia, Anaplasia).

Nomenclatura e classificazione delle neoplasie. Tumori benigni e Tumori maligni. Caratteri distintivi. Principali caratteristiche delle cellule trasformate in vitro ed in vivo

Meccanismi patogenetici dei tumori. Cancerogenesi a più stadi: Iniziazione, promozione e progressione neoplastica.

Principali classi di cancerogeni chimici e fisici e loro meccanismi di azione (Idrocarburi policiclici, Amine aromatiche, azocomposti, nitrosamine, aflatoxine, Elementi inorganici cancerogeni. Radiazioni ionizzanti ed ultraviolette). Attivazione metabolica. Tipi di interazioni tra cancerogeni e DNA. Meccanismi di riparazione del DNA. Test di Ames.

Nozioni di cancerogenesi virale. Cellule permissive e non permissive. Virus oncogeni a Dna ed Rna.

Classificazione e Meccanismi d'azione. Papilloma virus, Epstein-Barr virus, Virus Epatite B meccanismi patogenetici.

Gli oncogeni: definizione, classificazione, proprietà e meccanismi di attivazione e d'azione delle varie classi di oncogeni.

I geni oncosoppressori definizione, proprietà e meccanismo d'azione con particolare riguardo agli oncosoppressori Rb e p53.

Ruolo degli oncogeni e degli oncosoppressori nella trasformazione neoplastica.

Invasività neoplastica e Metastasi. Meccanismi di formazione delle metastasi. Molecole di adesione, enzimi ed inibitori enzimatici coinvolti nell'invasione e nella formazione delle metastasi e loro meccanismo d'azione.

Meccanismi di neoangiogenesi.

INFIAMMAZIONE

Infiammazioni acute e croniche: definizione, classificazione ed etiologia

Patogenesi dell'infiammazione acuta. Recettori attivatori dell'immunità innata e dell'infiammazione.

Fisiopatologia delle cellule dell'infiammazione. Citochine infiammatorie. Fasi del processo infiammatorio: I segni cardinali. Aspetti vascolari ed emodinamici; Modificazioni del calibro e della permeabilità vasale.

Mediatori chimici: Classificazione e Meccanismi di attivazione ed azione delle varie classi di mediatori (Amine vasoattive, Fattori del complemento, Fattori della coagulazione, Metaboliti dell'acido arachidonico etc.).

Modificazioni del microcircolo. Formazione dell'essudato,. Differenze fra trasudato ed essudato. Attivazione delle cellule endoteliali; Marginazione, adesione e diapedesi leucocitaria; Meccanismi di chemiotassi e fagocitosi. Meccanismi battericidi ossigeno-dipendenti ed ossigeno-indipendenti dei fagociti.

Patogenesi dell'infiammazione cronica. Concetto di granuloma. Classificazione dei granulomi. Patogenesi, composizione cellulare e struttura differenziale dei granulomi

Esiti dei fenomeni infiammatori, i processi riparativi, la neoangiogenesi, i fattori angiogenetici. Proliferazione dei fibroblasti, deposizione di matrice e fattori coinvolti; Rimodellamento; Guarigione delle ferite; Guarigione

per prima e per seconda intenzione; Aspetti patologici della guarigione delle ferite; I cheloidi; Rigenerazione; Modelli di rigenerazione dei tessuti; Le cellule staminali.

IMMUNOLOGIA

Introduzione al sistema immunitario. Organi linfoidi primari e secondari. Proprietà generali della risposta immunitaria. Immunità umorale e cellula-mediata. Immunità innata ed Immunità acquisita. Il sistema linfatico e le cellule del sistema immune. Tolleranza centrale e periferica.

Sviluppo e selezione dei linfociti B e T. Distribuzione e ricircolazione delle cellule immunitarie. Antigeni e determinanti antigenici. Gli antigeni e gli immunogeni. Concetto di aptene e carrier. Gli anticorpi, struttura e funzione. Nozione di ibridoma ed anticorpi monoclonali

Il sistema maggiore di Istocompatibilità. Struttura e funzioni delle molecole solubili di riconoscimento degli antigeni (immunoglobuline) e dei recettori per gli antigeni dei linfociti B (BCR). Recettori per gli antigeni dei linfociti T (TCR). Basi molecolari della generazione della diversità delle molecole di anticorpi, BCR e TCR. Molecole del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC). Processamento e presentazione degli antigeni. Attivazione dei linfociti T e B. Principali meccanismi di trasduzione dei segnali di BCR e TCR. Ruolo delle citochine nell'attivazione delle risposte linfocitarie. Risposte anticorpali. Switch isotipico, ipermutazione somatica e maturazione dell'affinità degli anticorpi. Le risposte immunitarie. Reazioni di ipersensibilità (Tipo I, II, III, IV) meccanismi patogenetici. Alcuni esempi: allergia, shock anafilattico, angioedema, la reazione trasfusionale, l'eritroblastosi fetale, la febbre reumatica, il morbo di Graves, la malattia da siero, glomerulonefrite poststreptococcica. Meccanismi di insorgenza delle patologie autoimmuni. Nozioni d'interazione fra sistema immunitario e cancro.

LABORATORIO PRATICO:

COLTURE CELLULARI:

A) Metodi di sterilizzazione.

B) Colture cellulari:

Apparecchi: Cappa a flusso laminare, Incubatore, Centrifuga, Camera di Burker

Caratteristiche generali:

Piastramento; Conta cellulare; Amplificazione cellulare

Saggio di vitalità e crescita cellulare (Saggio MTT utilizzando lettore ELISA)

Crescita in agar e conta delle colonie

C) Estrazione di linfociti.

Testi consigliati:

QUALSIASI TESTO DI PATOLOGIA GENERALE PURCHE' TRATTI GLI ARGOMENTI OGGETTO DEL PROGRAMMA.

PONTIERI-RUSSO-FRATI
PATOLOGIA GENERALE
Editore : PICCIN

ROBBINS e COTRAN
LE BASI PATOLOGICHE DELLE MALATTIE
(PATOLOGIA GENERALE)
Editore ELSEVIER

MONCHARMONT
PATOLOGIA GENERALE
Editore: IDELSON-GNOCCHI

[Modifica](#)

- **.I. DI PATOLOGIA GENERALE ED ANALISI ETC.E LABORATORIO**
- **Ø ESERCITAZIONI DI LABORATORIO-MODULO DI PATOLOGIA**
- **Ø**
- **Ø DEFINIZIONE DEL PROCESSO DI STERILIZZAZIONE**

Una delle prime precauzioni che deve essere presa in laboratorio è quella di evitare la contaminazione delle colture cellulari da parte di agenti contaminanti presenti nell'ambiente come batteri o altri microrganismi. La contaminazione viene evitata sia attraverso l'uso di materiale sterile che curando attentamente la pulizia dell'ambiente di lavoro. La preparazione di materiale sterile viene realizzata mediante la sterilizzazione. Per "sterilizzazione" s'intende un processo che permette la completa distruzione di tutti i microrganismi presenti. Una volta che un prodotto è stato sterilizzato e correttamente sigillato esso rimarrà sterile indefinitamente.

Le procedure e le condizioni da adottare durante la sterilizzazione dipendono sia dalle forme che dal numero dei microrganismi contaminanti, nonché dalle proprietà fisiche e chimiche del materiale da sterilizzare.

- **Ø METODI DI STERILIZZAZIONE**

I mezzi di sterilizzazione ai quali, a seconda dei casi, si ricorre possono essere suddivisi in: fisici, chimici e meccanici.

I mezzi fisici comprendono il riscaldamento e le radiazioni ionizzanti e ultraviolette; i mezzi chimici riguardano

L'utilizzo di sostanze diverse quali: gli antibiotici e i gas tossici, i mezzi meccanici sono rappresentati dalla filtrazione che, al contrario delle altre modalità di sterilizzazione, non uccide gli agenti contaminanti ma li rimuove dai liquidi trattati.

Mezzi Fisici:

Sterilizzazione mediante riscaldamento

Si ottiene esponendo il materiale da sterilizzare ad alte temperature, letali per i microrganismi contaminanti, soprattutto perché provocano la denaturazione delle proteine. Può essere effettuata nei seguenti modi.

Sterilizzazione diretta alla fiamma. E' il metodo più semplice, usato per anse, aghi, pinze e bacchette di vetro. La sterilizzazione viene ottenuta passando questi oggetti più volte attraverso una fiamma, ad esempio quella di un becco Bunsen, un bruciatore costituito da un tubo metallico nel quale si immette un gas combustibile. Il flusso del gas richiama aria da due aperture regolabili, collocate alla base del tubo, cosicché al suo interno avviene la miscelazione tra combustibile (metano) e comburente (ossigeno dell'aria); ovviamente a seconda della quantità di aria miscelata si ottengono fiamme più o meno calde e quindi con diversa efficacia nell'effettuare la sterilizzazione.

Sterilizzazione con calore secco. Rappresenta un metodo molto diffuso per la sterilizzazione di oggetti di vetro e di metallo, ma non è applicabile a materiali che possono subire, quando sono esposti ad alte temperature, alterazioni nella struttura come avviene ad esempio nel caso di oggetti di: gomma, plastica e carta. Con questa metodica il materiale da sterilizzare è collocato in particolari stufe, dette stufe di Pasteur, e qui, riscaldato con aria calda, sterilizzato. A causa della bassa conducibilità termica dell'aria, questa forma di sterilizzazione richiede il raggiungimento di temperature elevate che devono essere mantenute per un certo periodo di tempo per garantire l'efficacia della procedura; la durata del trattamento è di 2 ore, quando si opera a 160°C, di 1 ora, nel caso in cui si ricorra ad una temperatura pari a 180°C. Per accertarsi che venga raggiunta, durante la procedura di sterilizzazione, la temperatura desiderata si può mettere nella stufa, come controllo, una provetta contenente un po' di polvere di un composto che fonde alla temperatura prestabilita (ad esempio la solfonamide, che fonde a 163°C). Grazie alle alte temperature raggiunte nel corso della sterilizzazione, tale procedura consente non solo di eliminare la maggior parte delle forme vegetative dei vari microrganismi ma anche le spore per le quali è però necessario un periodo di esposizione maggiore

alle alte temperature, circa 4 ore, dal momento che, avendo un bassissimo contenuto d'acqua nel citoplasma, risultano più resistenti.

Sterilizzazione a calore umido. Questa procedura è molto efficace ma può essere impiegata solo per sterilizzare materiale, come ad esempio terreni di coltura e liquidi in generale, che non viene danneggiato quando è sottoposto a pressioni di una certa entità prodotte dalla produzione di vapore. Sfrutta tale principio l'autoclave, uno strumento estremamente importante nella pratica microbiologica, assicura l'uccisione dei microrganismi, incluse le endospore, mediante l'utilizzazione di calore umido.

La sterilizzazione mediante calore prevede un trattamento che provoca la completa distruzione di tutti gli organismi.

Per ottenere tali risultati è necessario raggiungere temperature superiori al punto di ebollizione dell'acqua e ciò viene ottenuto immettendo vapore saturo sotto pressione nella camera a chiusura ermetica dell'autoclave.

Il principio è quello sfruttato dalle normali pentole a pressione, che infatti possono venire utilizzate con risultati soddisfacenti per sterilizzare piccole quantità di materiale.

La pressione usualmente utilizzata per la sterilizzazione in autoclave è pari ad 1 atmosfera, che permette di raggiungere una temperatura di 121°C; a questa temperatura il tempo di trattamento è generalmente di 10-15 minuti.

Se è necessario sterilizzare oggetti di grandi dimensioni, bisogna tenere presente che la diffusione del calore al loro interno sarà piuttosto lenta, e il tempo di sterilizzazione, quindi, deve essere sufficientemente lungo da consentire, anche alle parti più interne, di rimanere a 121°C per 10-15 minuti. Lo stesso vale per grandi volumi di liquidi: anche in questo caso sono necessari tempi di sterilizzazione più lunghi del normale.

E' necessario sottolineare che non è la pressione che si raggiunge all'interno dell'autoclave a provocare la morte dei microrganismi ma il fattore letale risulta essere l'elevata temperatura che raggiunge l'autoclave.

Alla fine del processo di sterilizzazione abbiamo spento l'autoclave ed il materiale sterilizzato è stato posto in una stufa a 60°C in modo tale che si asciugasse.

Sterilizzazione mediante radiazioni

Altro metodo estremamente importante ai fini della sterilizzazione è quello che prevede l'utilizzo di radiazioni ultraviolette ed i raggi γ e X. Tale metodica di sterilizzazione è sicuramente vantaggiosa perché consente

l'uccisione di agenti contaminati che sono resistenti a qualunque altro trattamento, ma è comunque ovvio che, trattandosi di radiazioni, l'applicazione di questa metodica richiede la disponibilità di adeguati impianti e di opportune protezioni per gli addetti.

Radiazioni ultraviolette. La radiazione UV nella sua frazione a lunghezza d'onda più corta, da 200 a 280 nm, ha trovato ampia applicazione per eliminare batteri, funghi, lieviti e virus. L'ampio utilizzo di questo metodo è dovuto al fatto che le radiazioni hanno massimo effetto germicida a circa 260 nm, lunghezza d'onda che coincide con la massima capacità di assorbimento del DNA, e ciò consente l'uccisione anche di quegli organismi che sono resistenti ad altri metodi di sterilizzazione. Tali radiazioni presentano una bassa capacità di penetrazione per questo possono essere usate solo per la sterilizzazione di superfici piane, che sono irradiate direttamente, e non possono essere usate per sterilizzare la parte interna delle pipette o delle piastre chiuse.

Raggi X e g. Anche i raggi X (lunghezza d'onda 10^{-1} -10 nm) e i raggi g (10^{-3} - 10^{-1} nm) vengono usati come agenti sterilizzanti, ma in un numero limitato di applicazioni perché il loro utilizzo richiede un generatore di raggi g ed un'adeguata protezione. La ionizzazione indotta da questi raggi può causare nei microrganismi alterazioni funzionali o morfologici che provocano la morte della cellula o la sua radicale trasformazione. Tali raggi, al contrario delle radiazioni ultraviolette, hanno un'elevata capacità di penetrazione e per questo vengono utilizzati per sterilizzare oggetti di vetro, plastica e metallo.

Mezzi Chimici:

Sterilizzazione chimica

I materiali sensibili alle alte temperature possono anche essere sterilizzati mediante l'esposizione a diverse sostanze chimiche dotate delle seguenti caratteristiche:

- a) Il composto deve essere efficace, cioè l'azione antimicrobica deve avvenire in breve tempo
- b) Il composto non deve portare alterazioni del materiale trattato
- c) La sua presenza non deve interferire con l'uso del materiale trattato
- d) Il composto deve essere atossico per gli esseri umani e gli animali

Tali sostanze possono avere azioni diverse, possono ad

esempio bloccare la crescita (sostanze batteriostatiche); possono uccidere (sostanze battericide) oppure possono determinare la lisi degli agenti contaminanti (sostanze batteriolitiche). In alcuni casi vengono usati come sterilizzanti gli antibiotici, solitamente quelli ad ampio spettro, che agiscono sia sui gram positivi che sui gram negativi (ampicillina, neomicina); più comunemente, invece, è usata una miscela di penicillina e streptomina, che risulta efficace e non tossica per la maggior parte delle cellule.

Ultimamente si è fatto strada l'utilizzo anche di reagenti anti-micoplasma (es: gentamicina anamicina) a causa del notevole uso di cellule e tessuti umani che sono fonte di micoplasmi.

La sterilizzazione chimica può anche essere fatta mediante l'utilizzo di gas tossici quali l'ossido di etilene. Quest'ultimo è un liquido incolore, facilmente combustibile e fortemente esplosivo in presenza di aria. Tale sostanza è attiva contro tutti i microrganismi comprese le spore batteriche. La sua attività sterilizzante dipende da alcune variabili rappresentate dalla concentrazione del gas, pressione di esercizio, tempo di esposizione, temperatura di utilizzo, umidità dell'ambiente. L'ossido di etilene viene utilizzato esclusivamente per la sterilizzazione di materiali o strumenti delicati che non possono essere sottoposti all'azione del calore in autoclave o stufa a secco. La sua capacità di penetrazione è notevole e può determinare l'assorbimento del gas da parte del materiale da sterilizzare. Pertanto, per evitare fenomeni tossici e irritativi dovuti alla presenza del gas residui occorre procedere alla rimozione areando il materiale a temperatura ambiente per circa 7 giorni; alzando le temperature tale periodo può essere ridotto a 12 ore con temperature di 50°C e a 8 ore con temperatura di 60°C.

Mezzi Meccanici:

Sterilizzazione per filtrazione

Si tratta del metodo più usato per sterilizzare liquidi contenenti sostanze che o sono termolabili oppure possono essere danneggiate dalle radiazioni. Tale metodica consiste nel lasciar passare il liquido da sterilizzare attraverso un filtro che deve trattenere gli agenti contaminati. Il suddetto filtro è costituito da materiale poroso e ogni poro ovviamente deve avere un diametro tale da lasciar passare il liquido e da trattenere gli agenti contaminanti. La maggior parte dei filtri usati

per le colture cellulari hanno pori di diametro pari a 0.2mm in grado cioè di rimuovere i comuni contaminanti, funghi e batteri, che hanno dimensioni maggiori. Detto questo bisogna però tener conto del fatto che i virus ed i micoplasmi in alcune fasi del loro ciclo vitale hanno dimensioni minori di 0.2mm e quindi devono essere rimossi da filtri dotati di pori di diametro più piccolo circa 0.1mm.

- **Ø COLTURE CELLULARI**

- **caratteristiche generali:**

Le colture cellulari interessano diversi campi della ricerca, che includono la biologia molecolare e cellulare, la virologia, l'immunologia. In molti casi rappresentano il materiale di partenza per l'estrazione di proteine o acidi nucleici, mentre in altri casi le cellule cresciute *in vitro* sono utilizzate per analizzare un determinato comportamento biologico (proliferazione, capacità di organizzare tessuti, proprietà adesive o di migrazione, risposta immunitaria). Le colture cellulari possono anche essere usate per eseguire test diagnostici o per rigenerare *in vitro* tessuti e organi.

La coltura di cellule *in vitro* si realizza isolando le cellule da un tessuto e ponendole in presenza di tutti i fattori e metaboliti necessari alla crescita.

Le cellule di origine emopoietica, che normalmente vivono in un mezzo fluido, crescono in sospensione nel terreno di coltura e sono in grado di moltiplicarsi *in vitro* senza aderire.

Invece le cellule che *in vivo* fanno parte dei tessuti solidi, crescono *in vitro* aderendo alla superficie delle piastre di coltura.

I componenti nutritivi sono contenuti nei terreni base disponibili in commercio sotto forma di liquidi sterili o di polveri da sciogliere e sterilizzare.

La crescita *in vitro* delle cellule aderenti è assicurata dalla presenza di tre elementi fondamentali nel mezzo di coltura: elementi nutritivi di base (glucosio, aminoacidi, sali minerali e vitamine), fattori di crescita e fattori adesivi. I fattori di crescita e di adesione sono presenti nel siero fetale bovino che in genere viene addizionato al

terreno base oppure aggiunti quando necessari al terreno di coltura. Ovviamente esistono in commercio diversi tipi di terreni che differiscono solitamente per il diverso tipo di aminoacidi e sali minerali e per la concentrazione del glucosio. Tutti i terreni hanno poi come caratteristica il fatto di poter essere utilizzati solo se presentano un pH di 7.3-7.4, in caso contrario sono ovviamente tossici per le cellule. Tale condizione di atossicità è ottenuta utilizzando incubatori contenenti una percentuale di CO₂ pari al 5%. La CO₂ presente nell'incubatore tende a controbilanciare la sua stessa produzione all'interno del mezzo e questo consente di mantenere il valore del pH costante a valori fisiologici.

Per avere un'indicazione visiva del pH delle colture cellulari ai terreni solitamente viene addizionati il rosso fenolo, un indicatore che ha un colore: rosso arancio a pH 7.3, giallo arancio a pH acido e rosso viola a pH alcalino. Se in contatto con la CO₂ dell'atmosfera il terreno, trattato con il rosso fenolo, diventa violaceo e non lo si può utilizzare perchè, essendo fortemente alcalino, è tossico per le cellule; se, invece, il colore è rosso arancio il terreno potrà essere utilizzato e man mano che le cellule poste in incubatore al 5% di CO₂ prolifereranno diventerà giallo a causa dell'acidificazione prodotta dal metabolismo cellulare; se, invece, la crescita si blocca, a causa di errori nell'attività cellulare oppure per la morte delle stesse cellule, il terreno diventerà violaceo non essendoci più attività metabolica all'interno della piastra.

Quindi una volta messe in coltura le cellule, in opportune condizioni di crescita, continuano a moltiplicarsi compiendo un numero limitato di divisioni cellulari (circa 50 o 100) prima di andare incontro a degenerazione e morte. Questo fenomeno avviene indipendentemente dalla presenza dei metaboliti appropriati per la crescita ed è noto con il nome di senescenza. Questo, ovviamente, non vale per le cellule immortali che si dividono senza limiti di tempo formando le colture cellulari continue; questo è il caso sia delle cellule tratte da tessuti tumorali sia delle cellule trasformate mediante infezione virale o trasfezione che riescono a raggiungere in coltura una densità maggiore rispetto alle cellule normali, perché non vanno incontro a degenerazione. L'immortalità ovviamente non è l'unico fattore che permette di distinguere le colture di cellule tumorali da quelle delle cellule normali, visto che le cellule tumorali e quelle trasformate riescono a crescere su terreni semi-solidi (es: soft-agar) cosa che non accade nel caso delle cellule normali.

E' importante sottolineare che tutti i procedimenti che coinvolgono le colture cellulari devono essere necessariamente effettuati con materiale sterile utilizzando una cappa a flusso laminare che consente di ottenere un ambiente sterile.

La cappa a flusso laminare viene utilizzata per proteggere

sia il prodotto dalla contaminazione che l'operatore.

La protezione dell'operatore è assicurata dalla barriera di aria frontale, in grado di impedire il passaggio di aerosol dall'interno all'esterno dell'unità e viceversa.

Le pareti della cappa possono essere in acciaio inox o in cristallo temperato. Lo schermo frontale, sempre in vetro, resistente agli UV, può essere inclinato per facilitare la visione e la manipolazione all'interno dell'area di lavoro. E' quasi sempre previsto un pannello asportabile per la chiusura dell'apertura frontale, su cui è in genere montata una lampada germicida UV per la sterilizzazione della camera di lavoro durante la notte. La lampada UV è abilitata al funzionamento solo quando il pannello di chiusura è posizionato correttamente nella zona frontale della cabina.

Nonostante la perfetta funzionalità della cappa a flusso laminare è buona norma per l'operatore pulire con acqua distillata e quindi con alcool il piano di lavoro della cappa prima e dopo ogni operazione per evitare ulteriormente qualsiasi possibilità di contaminazione.

Durante l'esercitazione di laboratorio osserveremo al microscopio la linea cellulare denominata NPA ed ottenuta da un melanoma umano tali cellule crescono nel mezzo di coltura denominato DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a cui viene aggiunto il 10% di siero fetale bovino, l'1% di glutammina, e l'1% di una miscela costituita da penicillina e streptomina.

- **amplificazione cellulare:**

Per poter amplificare le cellule bisogna eseguire i seguenti passaggi:

-Aspirare il mezzo di coltura dalla piastra contenente le cellule. Il mezzo di coltura deve coprire abbondantemente lo strato di cellule adese alla piastra in modo da non permettere alle cellule di venire a contatto con l'aria.

-lavare con tripsina per eliminare il terreno di coltura residuo

-aspirare la tripsina

-aggiungere 1ml di una miscela contenente tripsina ed EDTA (acido etilendiamminotetracetico) ed incubare a

37°C per circa 5 minuti, in modo che le cellule si stacchino dalla piastra e perdano i legami tra di loro. Infatti la tripsina è una soluzione enzimatica proteolitica che agisce a livello delle giunzioni intercellulari e dei desmosomi; l' EDTA è un agente che chela il Ca^{2+} , ione indispensabile per il processo di adesione cellulare.

-osservare al microscopio ottico la piastra, dove si potrà notare la presenza di cellule galleggianti, aventi una forma rotondeggiante

-raccogliere le cellule dalla piastra, con una pipetta sterile (sotto cappa) e trasferirle in una provetta sterile a fondo conico, chiudere la provetta

-centrifugare a 1100 rpm per 3 minuti

-aspirare il supernatante sotto cappa sterile

-sospendere il pellet cellulare con il terreno di coltura in modo da avere un composto omogeneo

-prelevare 10 ml del composto ed utilizzare la camera di burker od un apparecchio automatico, per determinare la concentrazione cellulare

-prelevare quindi una aliquota di cellule sospese nel terreno e diluirle con il mezzo adatto e distribuirle nelle piastre sterili

-osservare al microscopio ottico le cellule galleggianti nel mezzo di coltura, in modo da valutare la congruità delle cellule piastrate. Porre le piastre nell'incubatore termostato a 37°C e 5% CO_2 , dopo circa 2-3 ore è possibile osservare le cellule che iniziano ad attaccarsi alla piastra ed acquisire la propria forma.

- **conta cellulare: camera di Burker**

Per la conta cellulare è stata utilizzata la camera di Burker. Tale apparecchio è caratterizzato da una griglia standardizzata costituita da 9 quadrati. La media del numero di cellule che si contano nei 9 quadrati viene moltiplicato per un valore fisso 10^4 (poichè ogni quadrato rappresenta un volume totale di $0,1 \text{ mm}^3$) e si ottiene quindi il numero di cellule in 1 ml di soluzione.

- **saggio di proliferazione cellulare: MTT**

La misura della vitalità e della crescita cellulare costituisce un prezioso strumento in un ampio range di area di ricerca e serve a valutare anche la sopravvivenza cellulare dopo trattamento con diverse sostanze tossiche. (Vedi Protocollo operativo). Il saggio MTT è basato sulla riduzione dei sali di tetrazolio ed è una metodica riconosciuta come sicura, veloce e accurata. Alla fine del saggio, il sale giallo di tetrazolio è ridotto nelle cellule attive metabolicamente per formare cristalli insolubili purpurei di formazano, che sono poi solubilizzati dall'aggiunta di un detergente il dimetilsolfossido (DMSO).

In questo test le cellule colorate sono quelle vive e la loro vitalità può essere quantizzata tramite una lettura spettrofotometrica utilizzando il lettore per micropiastre denominato ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Il valore dell'assorbanza ottenuto è direttamente proporzionale alla concentrazione; quindi maggiore è l'assorbanza maggiore è il numero di cellule vitali.

PROTOCOLLO:

Si piastrano le cellule, diluite nell'appropriato mezzo di coltura, nelle piastre da 96 pozzetti (multiwell), si lasciano aderire e quindi crescere. Dopo 24-48 dal piastramento si aspira il supernatante e si aggiunge ai singoli pozzetti una soluzione della sostanza citotossica, sciolta nel mezzo di coltura, la cui tossicità si vuole determinare. Chiaramente la sostanza citotossica deve essere utilizzata a concentrazioni diverse e lasciata a contatto delle cellule per periodi di tempo diversi. Alla fine del periodo di trattamento, si aspira il supernatante e si aggiungono in ciascun pozzetto 100 µl della soluzione contenente MTT il sale di tetrazolio. È necessario, quindi, incubare, al buio, la multiwell per circa 4 ore a 37°C (durante tale periodo è possibile osservare al microscopio ottico la formazione dei sali di formazano-MTT). Alla fine dell'incubazione si aspira il supernatante e si aggiungono 100 µl di DMSO per pozzetto. Tale sostanza serve a solubilizzare le cellule, i cristalli ed a rilasciare il colorante presente all'interno della cellula. La multiwell viene posta, quindi, su una piastra agitante, per 5 minuti, ad agitazione moderata per poter permettere la solubilizzazione delle cellule e la formazione di una soluzione omogenea. Alla fine dell'agitazione si pone la piastra direttamente sul multiwell reader che legge l'assorbanza a 492 nm. Dai valori di assorbanza ottenuti per ciascun pozzetto, direttamente proporzionali alla quantità di cellule vitali, si ricaverà il grafico corrispondente da cui si potrà ricavare l'effettiva azione citotossica svolta dalla sostanza in

esame.

Per preparare la soluzione madre si sciolgono 5 mg di polvere MTT in 1 ml di H₂O bidistillata, si mescola la soluzione con un vortex in modo da sciogliere bene l'MTT. Tale soluzione madre, prima dell'uso deve essere diluita 1:5 il con terreno completo specifico utilizzato per crescere le cellule.

- **crescita in soft agar**

Per valutare il grado di malignità delle cellule tumorali è possibile utilizzare un saggio che permette di discriminare le cellule normali da quelle neoplastiche. Tale tecnica è conosciuta come "crescita in soft agar". E' noto, infatti che le cellule normali non crescono in agar, mentre le cellule tumorali in agar riescono a sviluppare delle colonie il cui numero è in relazione al grado di malignità del clone cellulare.

PROTOCOLLO:

-Si scioglie il BACTO-AGAR in H₂O MQ (bidistillata) e si prepara una soluzione madre al 2%; tale soluzione viene poi sterilizzata in autoclave.

-Sul fondo di una piastra si mette una soluzione di agar allo 0,8% quindi la soluzione madre va diluita e riscaldata per permettere all'agar di sciogliersi. Bisogna calcolare il fattore di diluizione: $AGAR\ 2\% / 0,8\% = 2,5$, per un volume finale di 2 ml quindi si devono aggiungere 800 ml di agar e 1200 ml di terreno di coltura e si aspetta che l'agar solidifichi.

-Si prelevano quindi le cellule tumorali e le si sospendono in una soluzione di agar allo 0,35%, tale operazione deve essere effettuata ad una temperatura tale che l'agar sia sciolto e che le cellule non muoiano (cioè fra 37-40°C). Tale composto si stratifica sul precedente strato solidificato di agar e si aspetta che il nuovo composto diventi solido. Esempio: se si vogliono piastrare 40×10^3 cellule raccolte in 100 ml di terreno di coltura si dovranno aggiungere 1551 ml di terreno di coltura e 351 ml di agar allo 0,35%.

-Infine, si aggiungono circa 500 ml di terreno completo in modo che l'agar non sia a diretto contatto con l'aria.

-Dopo circa 10 giorni è possibile contare, utilizzando il "Colony counter quartz", le colonie formatesi.

N.B. Si ricorda che l'agar solidifica ad una temperatura di 37°C circa, quindi tutte le operazioni con l'agar devono essere effettuate ad una temperatura leggermente superiore che permetta all'agar di sciogliersi e nel contempo non sia letale per le cellule.

ESTRAZIONE LINFOCITI

Protocollo di isolamento di peripheral blood mononuclear cells (PBMC) da sangue periferico (da sacca di sangue concentrata, buffy coat) Tutte le operazioni devono essere effettuate in una cappa sterile e indossando guanti monouso. Si utilizza sangue privato dei globuli rossi e delle piastrine ricco quindi di elementi della serie bianca.

1. Versare in 2 provette sterili da 50 ml il contenuto della sacca;

1. Diluire il sangue 1/2 o 1/3 con mezzo di coltura (RPMI a cui sono stati aggiunti 2% di una miscela costituita da penicillina e streptomina, 1% di sodio piruvato 2% di siero fetale bovino e 2% di ciproxin) o soluzione salina (PBS);

1. In una provetta sterile a fondo conico si distribuiscono 10 ml di Ficoll (un polimero di destrano che ha una densità maggiore dei linfociti ma minore dei globuli rossi e dei granulociti) e si stratifica, con una pipetta, lentamente il sangue, precedentemente diluito, in rapporto 1/3 (esempio 30 ml di sangue su 10 ml di Ficoll)

1. Si equilibra la centrifuga a bracci oscillanti e la si programma per una corsa a circa 2500 rpm per 20 min. senza freno in modo che le due fasi non si mescolino;

1. Dopo la centrifugazione nella provetta si osserveranno:

a) sul fondo della provetta i granulociti insieme con

eventuali globuli rossi

b) l'anello di PBMC che sarà visibile all'interfaccia tra siero e Ficoll;

1. Si prelevano con una pipetta i PBMC e li si ripongono in un'altra provetta sterile da 50 ml in cui si aggiungono 10 ml di mezzo completo per lavare i linfociti dal Ficoll;

1. Si centrifuga per 5 min. a 1800 rpm con freno;

1. Si elimina il supernatante privo di cellule e si risospendono le cellule (pellet) in 10 ml di mezzo per poi contarle nella camera di Burker (per ottenere la concentrazione desiderata si può eventualmente diluire ulteriormente il campione),

1. I PBMC sono pronti per l'uso;

10. Si utilizzano circa 100 μ l della soluzione contenente i PBMC mettendoli in una piastrina sterile a cui si aggiungono 2 ml di terreno di coltura contenente la fitoemoagglutinina (fattore di crescita necessario per i linfociti) alla concentrazione finale di 1 μ g/ml,

11. Si osserva al microscopio per valutare l'effettiva efficienza di piastramento.