

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE.
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
indirizzi: Diagnostica Molecolare - Biosicurezza
Anno accademico 2012/2013

Corso di patologia e fisiopatologia generale e molecolare e laboratorio.

TITOLARI DEL CORSO:

Prof. PAOLO LACCETTI / ANTONIO PORCELLINI

PROGRAMMA D'ESAME

Fisiopatologia del sangue e degli organi emopoietici.

Il sangue: composizione e principali valori ematologici.

Eritropoiesi, fattori di crescita emopoietici, cellule staminali. Compartimenti progenitori commissionati, precursori. Antigeni di superficie dei progenitori emopoietici, fattori di regolazione positivi.

Elementi cellulari del pool maturativo emopoietico: proeritroblasto, eritroblasto basofilo, policromatofilo, ortocromatico, reticolocito, eritrocito. Caratteristiche citoplasmatiche e funzionali delle cellule del pool maturativo emopoietico. Rapporto fra differenziazione morfologica e biochimica.

Eritropoietina: struttura e funzione. Altri fattori necessari per l'eritropoiesi (ormoni, vitamine, minerali).

Sintesi dell'eme e delle globine. Composti eminici e non eminici.

Il ferro: assorbimento, trasporto, utilizzazione, deposito. Distruzione fisiologica del sangue.

Esame emocromocitometrico: valori normali e patologici. MCV, MCH, MCHC, valore globulare.

Alterazione degli eritrociti: microciti, macrociti, sferociti etc.

Funzione del sangue: ossigenazione, trasporto, catabolismo, difesa.

Anemie: definizione, classificazione in base al meccanismo patogenetico. Altri tipi di classificazione: anemie del I, II, III e IV gruppo. Anemie da difetto di produzione eritrocitaria. Anemie da aumento di emocateresi. Anemie emolitiche da cause intraglobulari: sferocitosi, ellissocitosi, acantocitosi. Anemie megaloblastiche: deficit di vitamina B12, deficit di acido folico, da farmaci. Anemie immunoemolitiche: classificazione e patogenesi.

Eritroenzimopatie: deficit piruvato chinasi, glucosio 6-p-deidrogenasi.

Emoglobinopatie: struttura e funzione dell'Hb. Afalciforme, HBM, HBC etc.

Talassemie: patogenesi e classificazione.

Diagnostica di laboratorio di tutte le anemie.

Fisiopatologia del fegato

Struttura e funzione delle cellule epatiche.

Le epatiti: A, B, C, D, E e G. Epidemiologia, patogenesi e diagnostica di laboratorio delle epatiti.

Sistema linfo-reticolare.

Organi linfoidi primari e secondari: struttura e funzione.

Leucocitopoiesi: granulocitopoiesi, monocitopoiesi e linfocitopoiesi.

Leucopenia e leucocitosi.

Le leucemie: classificazione, patogenesi e caratteri distintivi. Leucemie acute e croniche, leucemie mieloidi, leucemie linfoidi. Sindromi linfoproliferative: i linfomi, classificazione e caratteri distintivi. Gammopatie monoclonali: classificazione e caratteri distintivi.

Diagnostica di laboratorio di tutte le leucemie e dei linfomi.

Sindrome di immunodeficienza acquisita (AIDS), epidemiologia, eziologia, patogenesi e diagnostica di laboratorio.

Patologia molecolare degli acidi nucleici

Patologia del DNA.

Rottura del DNA; modificazione della sequenza nucleotidica; introduzione di nuove sequenze.

Effetti dell'alterazione della molecola di DNA su: *organizzazione; espressione; proprietà codogeniche.*

Patologia del RNA

Cause e conseguenze di: *assenza di trascritto; trascritti anormali; errori di trascrizione; alterazione dello splicing.*

Patologia molecolare generale delle proteine

Meccanismi generali di danno delle molecole proteiche e loro effetti

Patogenesi molecolare delle malattie

Effetti legati alla specifica funzione della proteina

Effetti legati all'accumulo improprio.

Sintomi legati alla tossicità della molecola alterata.

Patologia molecolare speciale delle proteine

Patologia molecolare dei recettori e altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale

Patologia molecolare del trasporto e dell'omeostasi ionica

Patologia degli enzimi

Patologia delle molecole citoscheletriche

Patologia delle molecole extracellulari

Patologia delle proteine coinvolte nella regolazione della proliferazione, del ciclo cellulare e della differenziazione.

Fisiopatologia molecolare di alcune malattie

Malattie associate con ritardo mentale e disturbi dell'apprendimento e della verbalizzazione: fenilchetonuria, sindrome dell'X fragile, ipotiroidismi congeniti, Tay-Sachs, Hurler.

Malattie con prevalente coinvolgimento muscolare:

le distrofie muscolari (Duchenne, Becker, distrofie dei cingoli, distrofia facio-scapolo-omeroale); la distrofia miotonica (malattia di Steinert); le glicogenosi.

Malattie con prevalente coinvolgimento dei tessuti connettivi e delle articolazioni:

la sindrome di Marfan; le sindromi di Ehler-Danlos; l'acondroplasia; l'artropatia gottosa.

Malattie sistemiche:

la fibrosi cistica, il diabete mellito; le ipercolesterolemie.

Principali alterazioni dello sviluppo somatopsichico associate con anomalie cromosomiche (Down, Patau, Edwards, Turner, Klinefelter).

Le anomalie del DNA mitocondriale.

Prevenzione delle malattie ereditarie

Screening genetico, diagnosi prenatale, metodiche di analisi molecolari e terapia genica

LABORATORIO:

Indagini di laboratorio per la diagnostica delle malattie descritte durante il corso con particolare attenzione ai test di PCR, ibridazione molecolare, sequenziamento del DNA, analisi di restrizione, elettroforesi per acidi nucleici e per proteine.

Principi teorico-pratici delle tecniche di amplificazione genica.

La PCR: Origine, descrizione del metodo, vantaggi, limitazioni.

Metodologie basate sulla PCR e sue varianti: RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR); LCR; MLPA; DHPLC; PCR “in situ”.

Preparazione dei campioni, “acido nucleico” target”, i primers, la concentrazione di ioni magnesio, i desossinucleotidi trifosfati (dNTP), la DNA polimerasi, i parametri di amplificazione, il termocicizzatore.

Controllo delle contaminazioni: Le contaminazioni, Precauzioni generali, Strategie e metodiche di uso corrente in diagnostica molecolare: inattivazione del DNA amplificato.

Resa della PCR.

Stechiometria della reazione

L’effetto Plateau

Tecniche per il miglioramento della reazione

Real Time PCR

Principi di base, strategie per il monitoraggio della cinetica di reazione: i fluorocromi intercalanti, le sonde fluorescenti (TaqMan, Beacon, Scorpion, FRET)

Tecniche per la rivelazione e l’analisi dei prodotti di PCR.

L’elettroforesi su gel

Digestione con endonucleasi di restrizione

Tecniche di ibridazione

Il sequenziamento automatico

L’HPLC

L’elettroforesi capillare

DGGE

SSCP

Utilizzo clinico della PCR:

Diagnosi molecolare delle malattie genetiche.

Determinazione qualitativa e quantitativa delle infezioni da HCV ed HIV. Determinazione dei genotipi dell’HCV. Determinazione dell’HBV DNA.

Modalità di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni biologici. Preparazione dei campioni, dei reattivi e modalità di esecuzione delle indagini.

Interpretazione dei risultati.

Citofluorimetria a flusso.

Principi di citometria; nozioni fondamentali di fluorescenza e fluorimetria.

L’importanza di una buona procedura di calibrazione, compensazione, manutenzione e preparazione del campione

Metodi di indagine, analisi citometrica e rappresentazione dei dati.

Analisi Multiparametrica in Citofluorimetria: le potenzialità di nuovi fluorocromi.

Analisi ciclo cellulare, contenuto di DNA ed apoptosi: Contenuto di DNA; Apoptosi (picco ipodiploide, annessina V, TUNEL); BrdU.

Analisi proliferazione cellulare, citotossicità

Analisi e isolamento di popolazioni rare mediante citofluorimetria

Caratterizzazione fenotipica e funzionale di linfociti T antigeni specifici.

TESTI CONSIGLIATI

Testi online/cartacei

Pagon - GeneReviews - University of Washington, Seattle, 1993-2012 Inglese; Online - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>

Ross - Introduzione alla Medicina Molecolare. Edito da Springer, 2005;
ISBN:978-88-470-0322-4

Ciro Balestrieri e coll. - Diagnostica Molecolare nella medicina di laboratorio. Edito da Piccin, 2009; ISBN: 978-88-299-2009-9

Robbins e Cotran - Le basi patologiche delle malattie. Volume Unico di Patologie Generale. Edito da Elsevier, 2010; ISBN:9788821431746

Pontieri - Patologia Generale e Fisiopatologia Generale III ediz. Edito da Piccin, 2012;
ISBN: 978-88-299-2142-3

Pontieri, Russo, Frati - Patologia Generale. Edito da Piccin, 2010; ISBN: 978-88-299-2036-5

Regueiro Gonzalez e coll. - Immunologia. Edito da Piccin, 2011; ISBN: 978-88-299-2154-6

Moncharmont e coll. - Patologia Generale. Edito da Idelson-Gnocchi, 2012;
ISBN:978-88-7947-542-6

Siti Internet di consultazione:

Citofluorimetria

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/4Intro_Flow/player.html

http://biology.berkeley.edu/crl/cytometry%20_compensation.html

<http://flowbook.denovosoftware.com/>