

LA SPERIMENTAZIONE *IN VITRO* IN CAMPO ONCOLOGICO

Conoscenze teoriche di base e tecniche operative

Dott. Adriano Angelucci
LTCM applicate -- Maggio 2011

Approcci sperimentali

- Sperimentazione preclinica
 - Saggi *in vitro* = colture cellulari
 - Saggi *ex vivo* = tessuti espantati
 - Saggi *in vivo* = modelli animali

- Sperimentazione clinica
 - Trial clinici
 - Fase 1 = trasformazione e farmacocinetica
 - Fase 2 = confronto tra farmaco e placebo
 - Fase 3 = ampio numero di pazienti nelle condizioni abituali di trattamento

Caratterizzazione cellulare

- Linea primaria: coltura di cellule prelevate da tessuto (pura o mista)
- Linea cellulare: unico tipo cellulare adattato alla vita in coltura (monoclonale)
- Linea cellulare continua (stabile): coltura in grado di sopravvivere oltre il limite di Hayflick
 - Trasformata (immortalizzate)
 - Tumorale

Obiettivi colture in vitro

- Attraverso l'applicazione di specifiche procedure e tecnologie si occupa:
 - Mantenimento in vitro delle migliori condizioni di sopravvivenza di cellule eucariotiche
 - Permettere la proliferazione delle cellule
 - Preservare da modifiche biologiche le cellule e da contaminazione l'operatore
 - Realizzazione di banche per il mantenimento di campioni cellulari

Problematiche

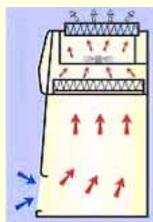
- Rischio per l'operatore
- Contaminazione da microorganismi (batteri, funghi, micoplasma)
- Contaminazione con altre popolazioni cellulari
- Mantenimento dei caratteri biologici di partenza

Laboratorio

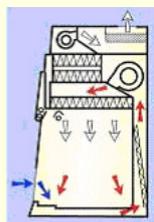
- Area isolata e autosufficiente
- Doppia area fisica o temporale: quarantena e routine
- Linee guida per la disposizione degli strumenti e la sicurezza del personale
- Strumentazione minima:
 - Cappa biologica (Biological Safety cabinet)
 - Incubatore
 - Centrifuga
 - Microscopio a contrasto di fase
 - Contenitore di azoto liquido

Cappe biologiche

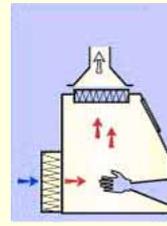
- Si distinguono in base al livello di contenimento in tre classi
- Protezione microbiologica (II e III)
- Vari gradi di protezione per l'operatore
- Filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air)



Classe I



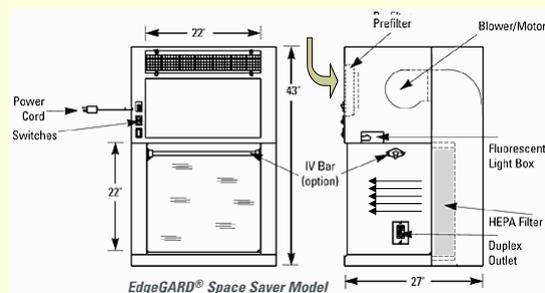
Classe II



Classe III

Cappe biologiche

- Cappa a flusso orizzontale
- Protezione microbiologica per le colture
- Nessuna protezione per l'operatore
- Filtri HEPA in entrata

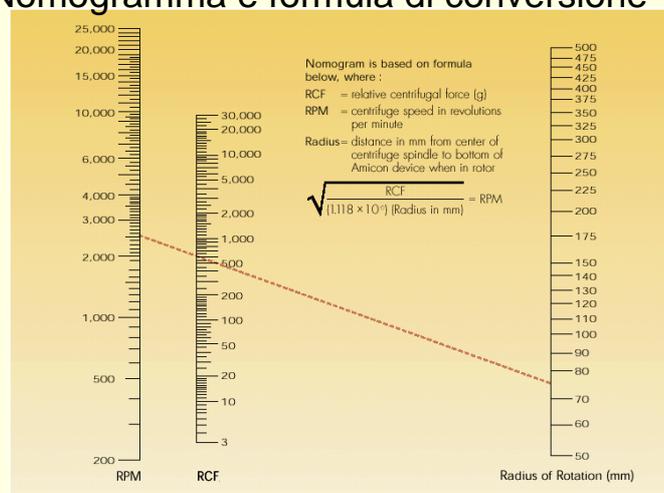


Centrifuga

- Separare le cellule dal liquido
- 300 g x 5 minuti è l'accelerazione per sedimentare le cellule senza danneggiarle
- Raccomandazioni:
 - Bilanciamento
 - Aerosol
 - Rottura delle provette

Centrifuga

- Nomogramma e formula di conversione



Microscopio a contrasto di fase

- Permette di osservare cellule non colorate
- Frederick Zernike Premio Nobel Fisica 1953
- Limitazioni:
 - Alone che circonda le cellule
 - Bassa risoluzione (obiettivo 40x)
 - Permette l'osservazione solo di campioni sottili

Morfologia

- Le cellule in coltura possono crescere adese o in sospensione
- La morfologia è caratteristica del tessuto di origine



epiteliali



neuronali

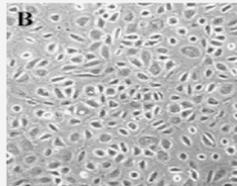
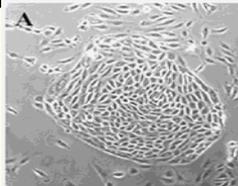


fibroblasti

Morfologia

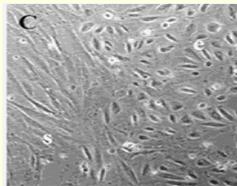
- La morfologia è indicatore dello stato della cellula

crescita a isole

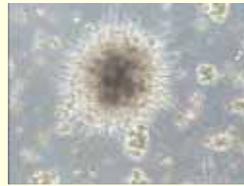


crescita
uniforme

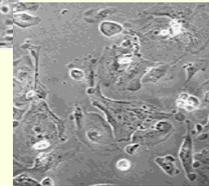
- Presenza di contaminazioni



Popolazione mista



muffa



Cellule sofferenti

Sistemi tampone

- Il mantenimento del pH è importante soprattutto nelle colture primarie
- Il pH ottimale è funzione del tipo cellulare (compreso tra 7,0 e 7,7)
- Tampone "fisiologico" $\text{CO}_2/\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ in atmosfera al 5-10% CO_2
- Tampone HEPES (7,2-7,4) può essere tossico
- Rosso fenolo come indicatore di pH

Contaminazione da microorganismi

- I principali tipi di contaminanti microbici
 - Batteri e funghi
 - Micoplasma
 - Virus
- La contaminazione può avvenire:
 - Errore dell'operatore
 - Terreni contaminati
 - Cappa biologica non funzionante
 - Incubatore contaminato
 - Conservazione in azoto liquido contaminato

Disinfettanti

- Principale mezzo per limitare i rischi di contaminazione
- Ipoclorito
 - Disinfettante ad ampio spettro, efficace contro virus
 - Corrosivo per i metalli, non può essere associato ad altri disinfettanti
 - Viene rapidamente inattivato in presenza di composti organici
 - 1000ppm per uso generale e 10000ppm per smaltire terreni
- Fenoli
 - Non attivo su virus
 - Stabile in presenza di composti organici
- Alcoli
 - Efficaci al 70% (etanolo) e 60-70% (isopropanolo)
 - Etanolo attivo contro batteri e virus con capsidi
 - Isopropanolo non efficace contro virus
- Aldeidi (gluteraldeide, formaldeide)
 - Altamente irritanti
 - Possono essere usati su superfici metalliche e in forma gassosa

Metodi di disinfezione/sterilizzazione

- Lampada UV (germicida)
- Sterilizzazione in autoclave
 - 121°C per almeno 15 minuti
- Vanno regolarmente pulite tutte le superfici di:
 - Cappa biologica
 - Incubatore (alta frequenza)
 - Piano del microscopio
- Si devono smaltire con attenzione:
 - Terreni di coltura (ipoclorito per alcune ore)
 - Consumabile a contatto con le colture (eliminato nei rifiuti appositi)

Protocollo: sottocoltura di cellule aderenti

- Le cellule smettono di crescere quando fino raggiungono il 100% di confluenza o in seguito ad esaurimento dei fattori nutritivi
- Le cellule vanno portate in sospensione
- Si utilizzano proteasi, soluzioni di proteasi e agenti chelanti o metodi meccanici

Procedura (1)

- Accertarsi della confluenza e dello stato delle cellule
- Rimuovere il terreno
- Lavare lo strato cellulare con PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ con un volume equivalente a metà volume del terreno usato. Ripetere se le cellule hanno alta capacità adesiva
- Aggiungere 1ml di tripsina/EDTA ogni 25cm² di superficie. Fare in modo che il liquido bagni tutta la superficie
- Mettere il contenitore in incubatore per 2-10 minuti

Procedura (2)

- Osservare le cellule al microscopio per accertarsi che siano in sospensione
- Agevolare il distacco meccanicamente
- Diluire le cellule in terreno contenente siero
- Centrifugare
- Scartare il surnatante e risospendere le cellule in un appropriato volume di terreno completo
- Contare le cellule
- Prelevare il volume contenente il numero di cellule necessario

Punti cruciali

- Diversi tipi cellulari hanno capacità adesive molto diverse
- La presenza di EDTA aiuta il distacco delle cellule
- L'eliminazione di siero è fondamentale per aumentare l'efficacia della tripsina
- L'esposizione prolungata a tripsina può danneggiare irreversibilmente le cellule
- La fase di centrifugazione può essere omessa se si usano elevate quantità di siero
- La tripsina danneggia le proteine di superficie

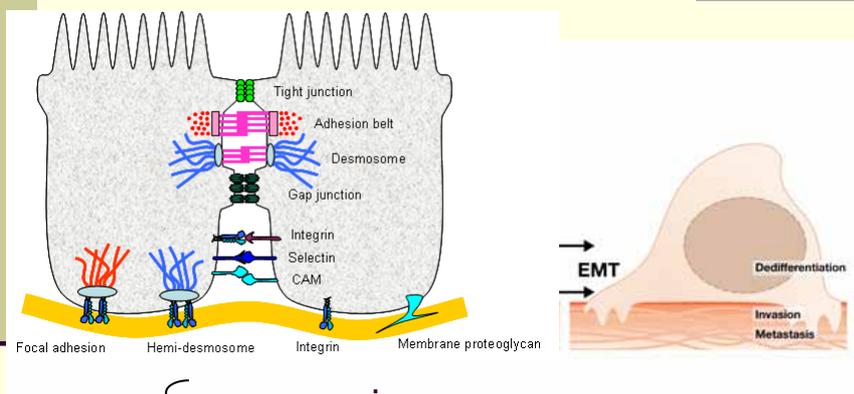
Procedura di conta

- Centrifugare
- Risospendere in un piccolo volume di terreno completo
- Prelevare 100 μ l di sospensione
- Aggiungere un ugual volume di Trypan Blue (0,4%)
- Riempire le camere del vetrino (5-10 μ l)
- Osservare al microscopio ad ingrandimento 20x
- Calcolare il numero di cellule secondo le specifiche del vetrino di conta (dimensioni del reticolo)

Punti cruciali

- Un'adeguata accuratezza della misura si ottiene contando almeno 100 cellule
- Il Trypan blue è tossico ed è un potenziale carcinogeno
- Le cellule devono essere ben distinte e uniformemente distribuite
- Evitare la presenza di bolle e detriti
- Non riempire eccessivamente la camera
- Se le cellule sono poche, operare una nuova centrifugazione e risospingere in meno terreno

Adesione cellulare

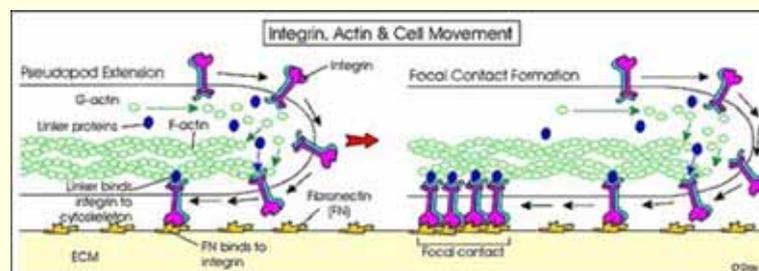


ancoraggio
migrazione – “homing”
comunicazione - anoikis

Tipologie di migrazione

- Chemotassi: movimento guidato da un fattore solubile
- Aptotassi: movimento guidato da sostanze presenti nella matrice extracellulare non diffusibili
- Chemotropismo: crescita (senza movimento) dei tessuti verso una sostanza attraente

Interazione con ECM



Integrine e ligandi

Integrin	Cell type	Major ligands
$\alpha 1\beta 1$	VEC, LEC	Collagen, laminin
$\alpha 2\beta 1$	VEC, LEC	Collagen, laminin, $\alpha 3\beta 1$
$\alpha 4\beta 1$	VEC, LEC, monocyte or macrophage	CS1 fibronectin, VCAM1
$\alpha 5\beta 1$	VEC, LEC	Fibronectin, L1-CAM
$\alpha 6\beta 1$	VEC	Laminin, merosin, kalinin
$\alpha 9\beta 1$	VEC, LEC	Tenascin, fibronectin, thrombospondin, VCAM, collagen, laminin

$\alpha M\beta 2$	Monocyte or macrophage	ICAM1, iC3b, fibrinogen
$\alpha \nu\beta 3$	VEC, LEC	Fibronectin, vitronectin, von Willebrand factor, thrombospondin, tenascin, DEL1, osteopontin
$\alpha \nu\beta 5$	VEC, LEC	Vitronectin, osteopontin, DEL1
$\alpha \nu\beta 8$	Glial cells	Collagen, laminin, fibronectin
$\alpha 6\beta 4$	VEC	Laminin 5