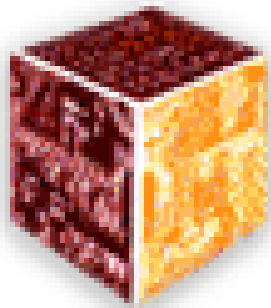


UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

Prof.ssa Luisa Gioia



Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche nuove)

“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*
(Ed. Wiley-Blackwell)

Testo di **COLTURE CELLULARI**



Le **COLTURE CELLULARI** possono rappresentare un utile strumento in campo biomedico in quanto rappresentano uno dei principali metodi per **studiare la tossicità sui sistemi viventi**.

Le colture cellulari vengono usate infatti come sistema *in vitro* per sperimentare gli effetti prodotti sulle cellule vive da composti potenzialmente tossici, di origine naturale o artificiale.

- Nel 1943 sono state ottenute da Earle le **prime linee continue di cellule di mammifero**
- Nel 1952 è stata ottenuta la **prima linea tumorale di origine umana (HeLa)** da Scherer et al.

VANTAGGI

- Sistemi semplificati vs organismo in toto
- Possibile controllo delle condizioni fisico-chimiche e fisiologiche
- Campione caratterizzabile e omogeneo
- Precoce identificazione di eventuali danni
- Facile verifica della reversibilità dell'effetto
- Minori costi vs sperimentazione animale
- Sistema altamente riproducibile

SVANTAGGI

- Sistemi più semplici vs organismo in toto
- Richiedono grande manualità ed organizzazione
- Condizioni di esposizione diverse da quelle *in vivo*
- Il terreno di coltura può interferire con le sostanze saggiate
- Non consentono lo studio degli effetti tossici mediati da ormoni o SNC
- Non consentono o studio della tossicità cronica
- Le cellule possono variare le loro caratteristiche nel tempo

*Le colture cellulari possono essere utilizzate per diversi scopi oltre a quello di **studi di tossicità**:*

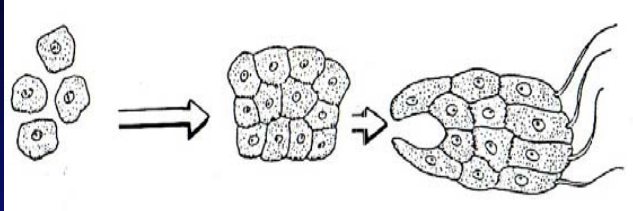
1) le cellule coltivate *in vitro* possono fungere da **materiale di partenza per l'estrazione di acidi nucleici o proteine** → ANALISI BIOCHIMICHE;

2) le cellule possono essere utilizzate per **studi funzionali o di regolazione**;

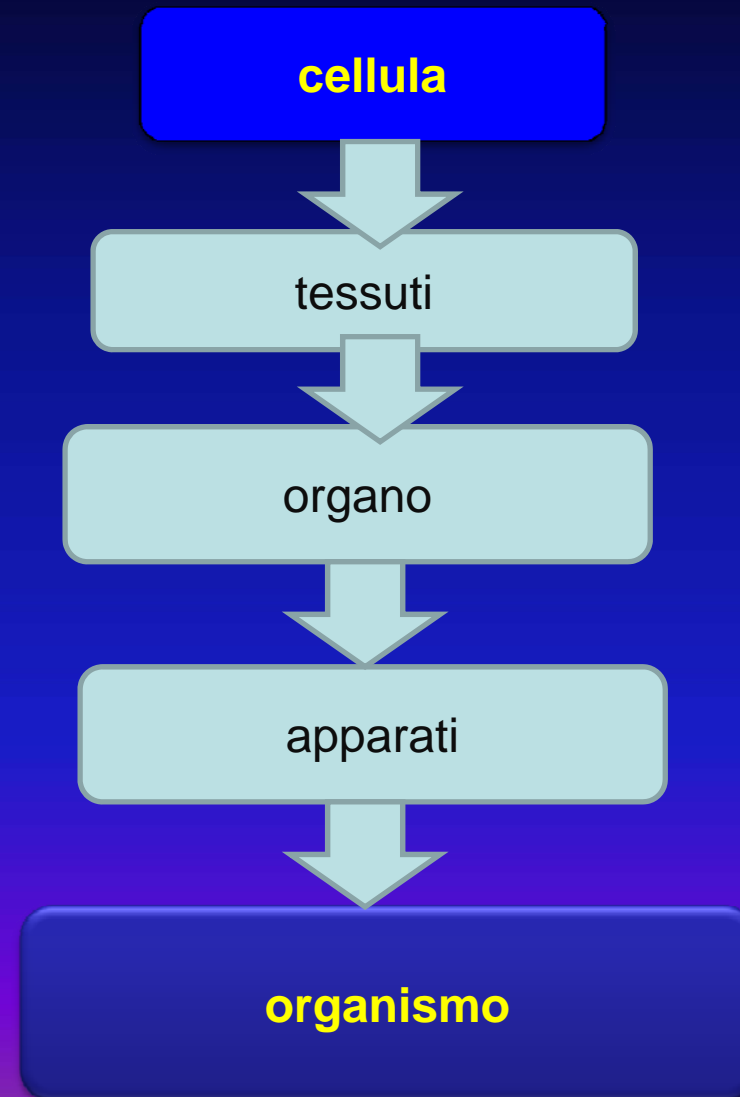
3) le cellule possono essere utilizzate per **rigenerare in vitro tessuti o organi**.

ORGANISMI PLURICELLULARI

sono organizzati in modo progressivamente più complesso



Le cellule si riuniscono in una colonia e si specializzano in particolari funzioni




Colture cellulari

- 1) **Isolamento delle cellule dal tessuto**
- 2) **Separazione delle cellule per tipi**
- 3) **Allestimento di colture cellulari**

ISOLAMENTO DI CELLULE DA UN TESSUTO

- **Disgregazione della matrice extracellulare** che unisce le cellule \Rightarrow **enzimi proteolitici** (tripsina*, pronase*, collagenasi, ialuronidasi): digeriscono le proteine della matrice extracellulare
- **Chelanti del calcio** (es. EDTA) agenti che legano il Ca^{++} , ione da cui dipende l'adesione cellula-cellula
- **Blanda agitazione**

* enzimi più potenti nella disgregazione ma devono essere utilizzati con cautela perché possono danneggiare le cellule!!!!



DISGREGAZIONE ENZIMATICA E MECCANICA DI TESSUTI VOLTA ALL'ISOLAMENTO DELLE CELLULE

- TESSUTO: lavaggi in soluzione fisiologica (il primo con disinfettante)
 - Preparare le **SOLUZIONI CONTENENTI GLI ENZIMI PER LA DISGREGAZIONE ENZIMATICA DEL TESSUTO:**
 - collegenase allo **0,1%** + ialuronidase **0,1%**, in tampone bilanciato
 - tripsina **0,25%** in soluzione salina con **0,2g EDTA**
 - continuare la disgregazione in modo meccanico
 - aggiungere **10% di FCS** per bloccare l'azione della tripsina
 - lavaggio
- ⇒al termine della disgregazione **effettuare la valutazione della vitalità cellulare**

VALUTAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE (test di esclusione del TRYPAN BLU)

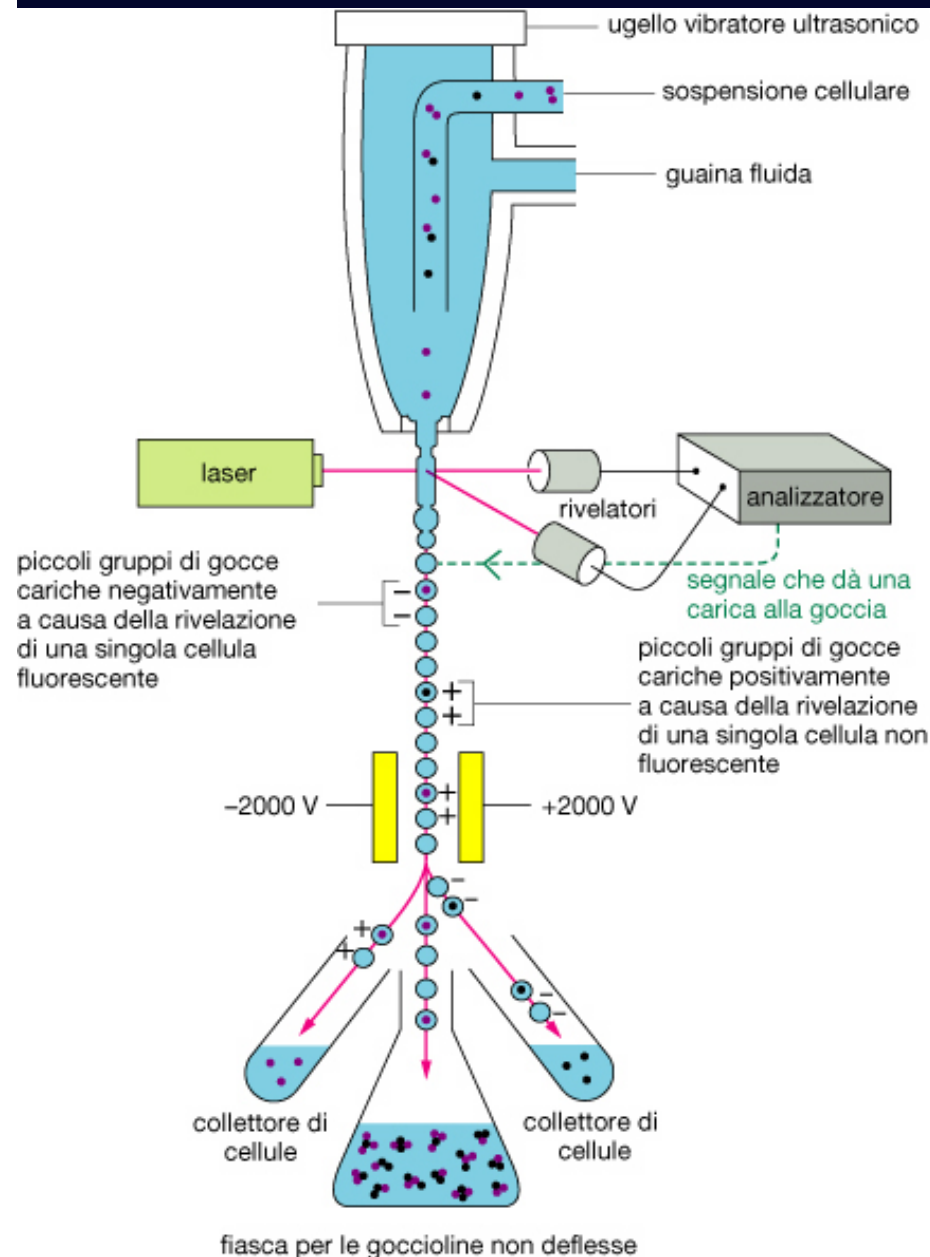
CONTEGGIO CELLULARE

Conteggio delle cellule vive utilizzando il **Burker**

SEPARAZIONE DEI DIVERSI TIPI CELLULARI DALLA SOSPENSIONE CELLULARE MISTA

- Differenza nelle proprietà fisiche, es. densità ⇒ **centrifugazione**
- Differenze di adesione a superfici di vetro o plastica
- Matrici (es. collagene) accoppiate ad **Ab specifici** per un tipo cellulare
- Ab fluorescenti specifici per un tipo cellulare ⇒ **separatore cellulare attivato dalla fluorescenza**
- Isolamento di cellule di interesse mediante **microdissezione per cattura laser**

Separatore cellulare attivato dalla fluorescenza



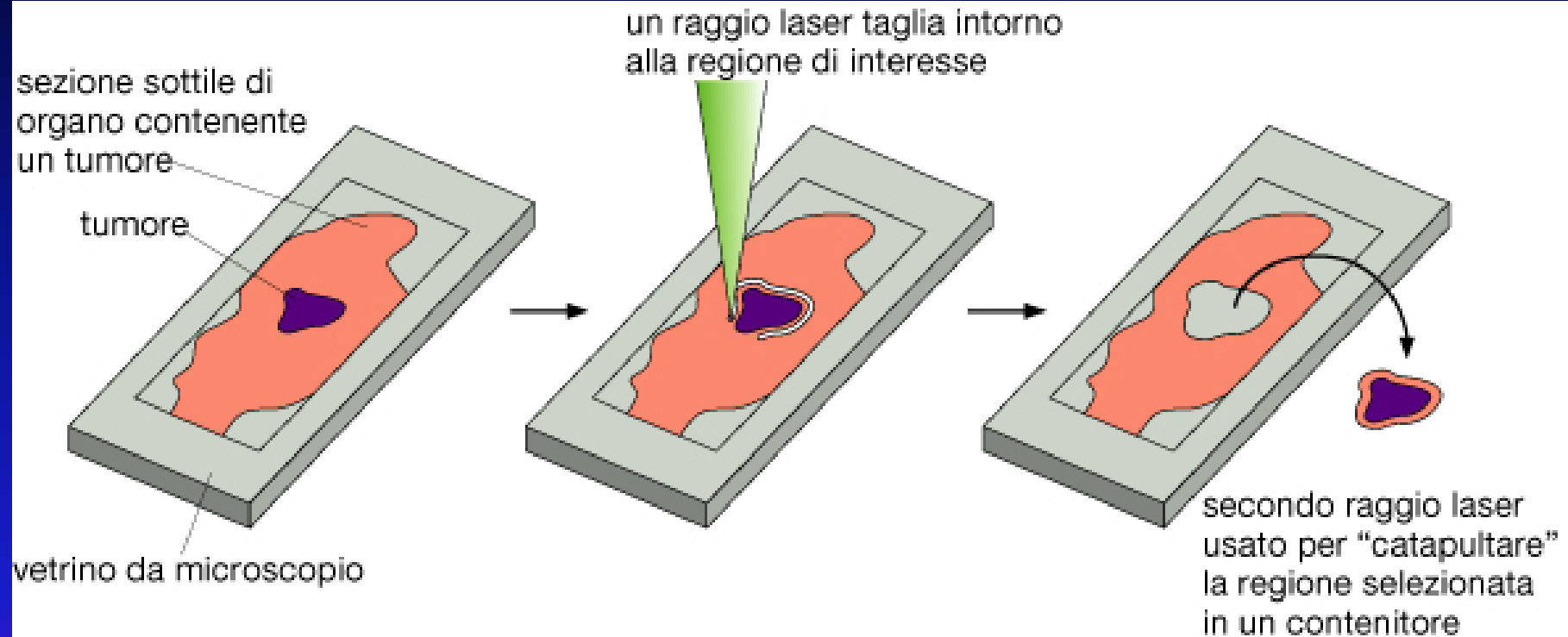
-La cellula che passa attraverso il raggio laser è monitorata per fluorescenza

-A seconda se fluorescente o no la cellula riceve carica + o -

-Un campo elettrico deflette le goccioline a seconda della loro carica in una provetta

-Le goccioline non cariche e gli aggregati fluiscono in una fiasca

Microdissezione per cattura laser



Un raggio laser taglia una regione di interesse (anche una singola cellula) da un tessuto e la espelle in un contenitore

POPOLAZIONE CELLULARE UNIFORME

```
graph TD; A[POPOLAZIONE CELLULARE UNIFORME] --> B[Analisi biochimiche]; A --> C["Coltura cellulare (proliferazione, studio del comportamento delle cellule in condizioni definite)"]
```

**Analisi
biochimiche**

Coltura cellulare
(proliferazione,
studio del comportamento
delle cellule in condizioni
definite)

COLTURE PRIMARIE

Le colture preparate **direttamente da un tessuto** si dicono **colture primarie**

tessuti di
derivazione
EMBRIONALE

- ❖ si disgregano più facilmente
- ❖ forniscono un maggior numero di cellule vive
- ❖ proliferano più rapidamente

vs tessuti derivati
da organismi
adulti

CURVA DI CRESCITA DELLE LINEE CELLULARI

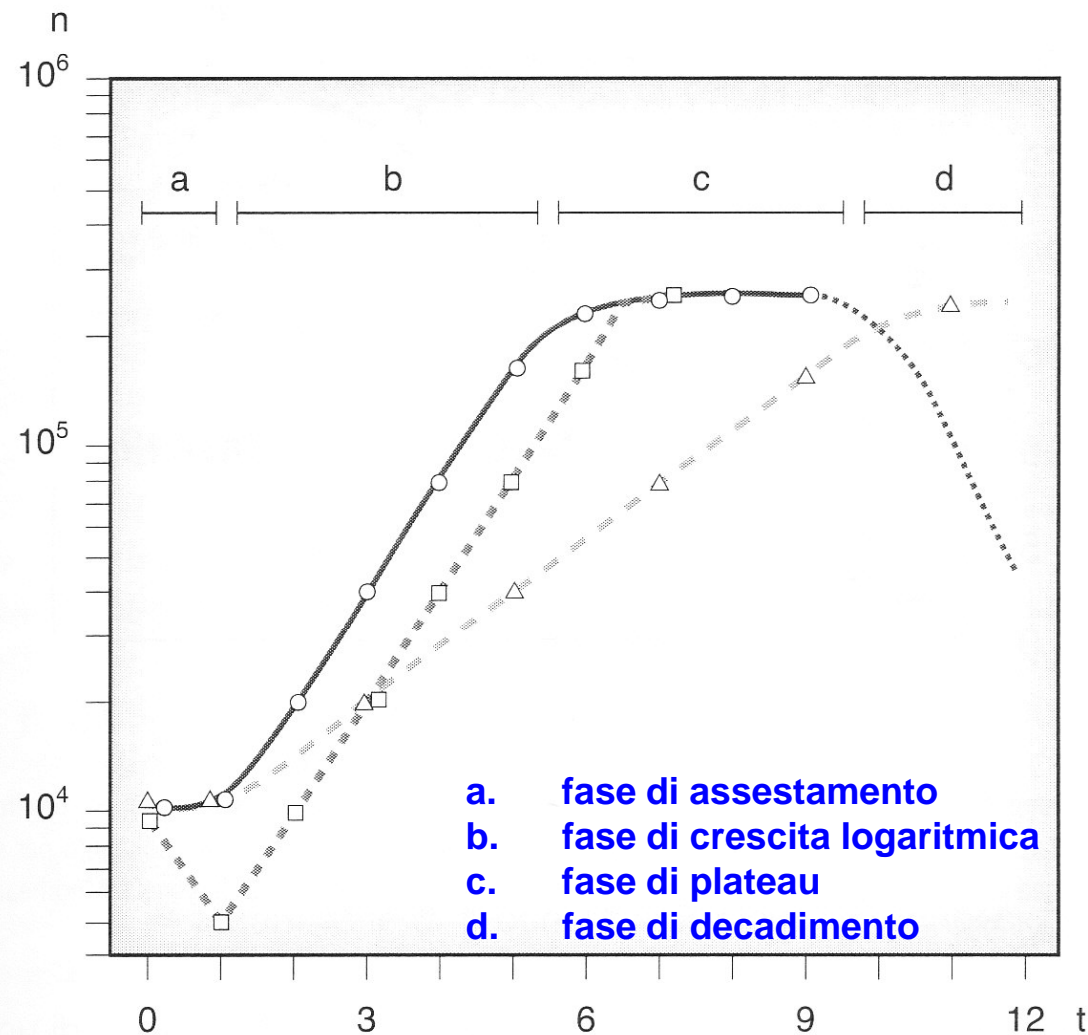


Figura 2.1 - Crescita di tre differenti linee cellulari: con efficienza iniziale di crescita del 100% e tempo di duplicazione di 24 h (○); con efficienza iniziale di crescita del 100% e tempo di duplicazione di 48 h (△); con efficienza iniziale del 50% e tempo di duplicazione di 24 h (□). n = cellule/ml, t = tempo (giorni), a = fase di latenza, b = fase esponenziale, c = fase stazionaria, d = fase di decadimento (da Bianchi, 1992, modificato).

Hayflick e
Moorhead, 1961

SUB-COLTURE

Una coltura primaria si presenta eterogenea

Vengono allestite **sub-culture** (*“passaggio delle cellule”*) per ottenere **linee cellulari** omogenee

Una linea cellulare ha generalmente un tempo di vita limitato

Tipologia di colture cellulari più particolari:

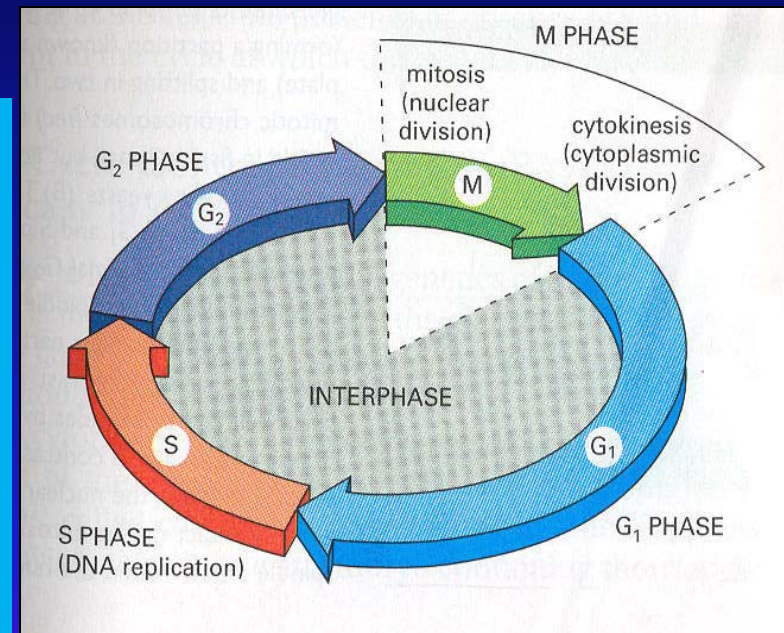
CO-COLTURE

Colture 3D

COLTURE PRIMARIE

Le cellule isolate da un qualsiasi tessuto animale sono in grado di compiere un **NUMERO FINITO DI DIVISIONI CELLULARI IN VITRO** (circa 50), dopodiché vanno incontro a degenerazione e morte.

Tale fenomeno avviene indipendentemente dalla presenza di metaboliti appropriati per la crescita e si indica come **SENESCENZA**.



LINEE CELLULARI CONTINUE

Derivano da singole cellule in cui mutazioni spontanee o indotte (ad es. da radiazioni, virus, eventi genetici, sostanze chimiche) hanno annullato il programma genetico della senescenza.

Si dicono perciò **immortali**: proliferano in modo continuo in presenza degli opportuni metaboliti.

Molte linee cellulari continue sono state ottenute a partire da tessuti tumorali (es. HeLa).

Le cellule **trasformate** presentano caratteristiche simili alle cellule cancerose: sono immortali, proliferano *in vitro* fino a raggiungere una densità maggiore delle cellule normali e, spesso, crescono senza legarsi ad alcuna superficie.

Per ottenere linee cellulari trasformate **si ricorre a mezzi chimici o a virus che inducono il tumore.**

ANDAMENTO DI UNA COLTURA CELLULARE NEL TEMPO

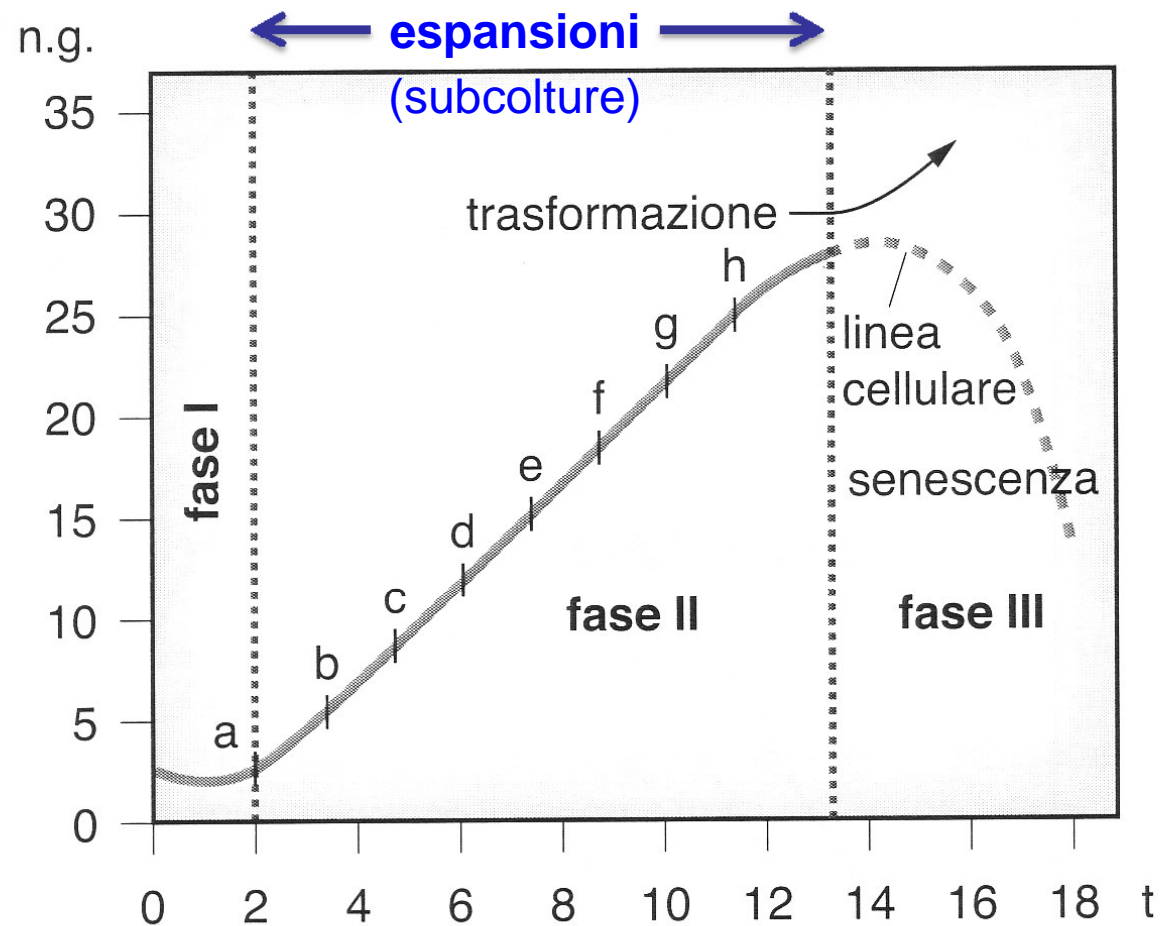


Figura 2.2 - Andamento di una coltura cellulare nel tempo. Fase I = coltura primaria. Fase II = crescita cellulare (è necessario effettuare "espansioni" che originano successive subcolture (a-h)). Fase III = decadimento per senescenza o sviluppo di una linea cellulare. n.g. = numero di generazioni; t = tempo (settimane) (da Hayflick e Moorhead, 1961, e da Stammati e Sambuy, 1994, modificato).

Colture cellulari

La crescita delle cellule *in vitro* viene assicurata dall'apporto di 3 tipologie di sostanze:

1. **elementi nutritivi di base** (glucosio, aminoacidi, sali minerali, ecc.) contenuti nel mezzo di coltura
2. **fattori di crescita** (presenti nel siero)
3. **fattori di adesione** (presenti nel siero)

Colture cellulari

Richieste di crescita da parte delle cellule in coltura

- **RICHIESTE QUALITATIVE:** elementi nutritivi del terreno di coltura
- Presenza del **SIERO** nel terreno di coltura

• **RICHIESTE FISIOLOGICHE:** temperatura, pH (atmosfera gassosa), umidità.

➤ **L'intero sistema di coltura deve essere STERILE e privo di effetti tossici o inibitori**

antibiotici?

Colture in sospensione o aderenti

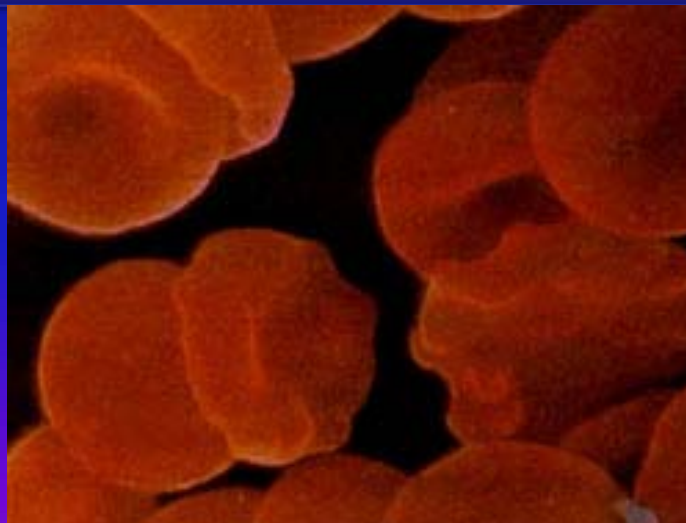
- Le cellule di origine emopoietica, che normalmente crescono in mezzo fluido, crescono **in sospensione** e si moltiplicano in vitro **senza aderire**.
- Le cellule che fanno parte di tessuti solidi crescono in vitro **in adesione** alla superficie delle piastre da coltura (**colture in monostrato**).

Tipologie di colture cellulari

- Coltura in **monostrato** o in **sospensione**

La maggior parte delle cellule vivono fisiologicamente organizzate in tessuti

Alcuni tipi cellulari fisiologicamente vivono IN SOSPENSIONE (es. cellule del sangue)



Colture di cellule aderenti

L'adesione è necessaria perché avvenga la crescita in vitro

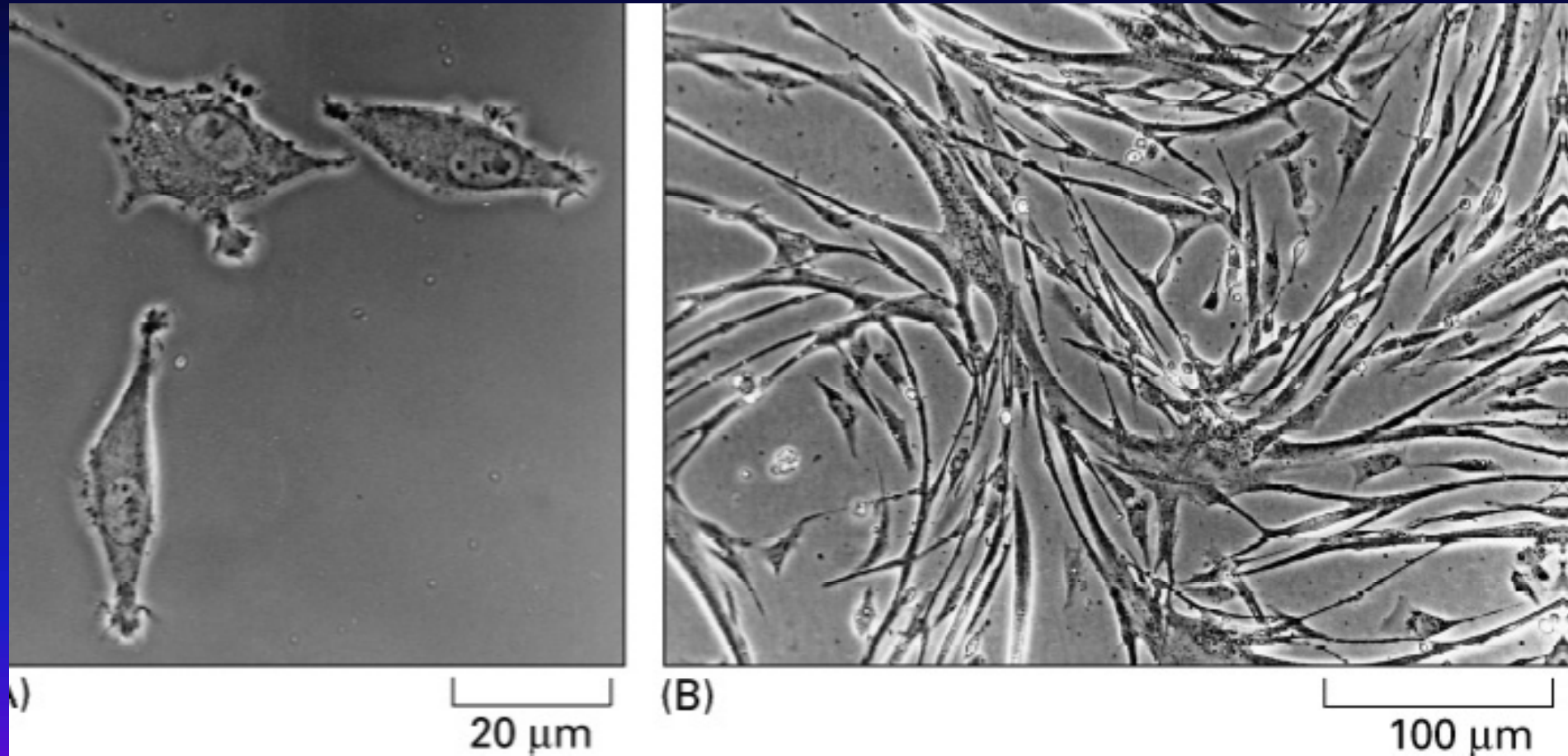


Figure 8-4 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

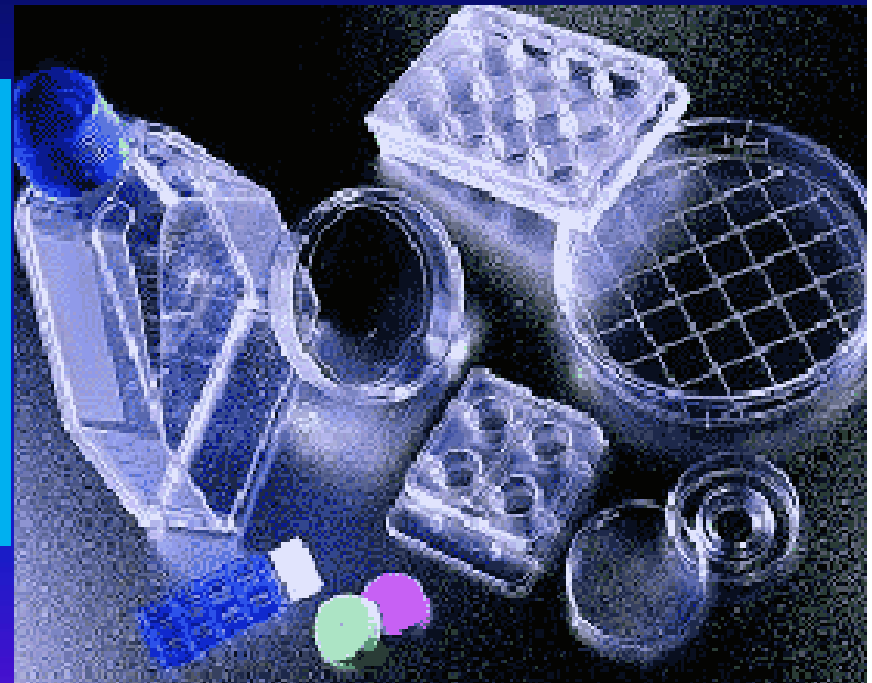
L'adesione dipende dall'interazione di recettori di membrana (*integrine*) delle cellule con le proteine adesive, adsorbite sulla superficie delle piastre da coltura.

Piastre da coltura

In commercio sono disponibili piastre per colture cellulari in **polistirene**, ma la superficie delle piastre da coltura è trattata chimicamente in modo da renderla **idrofila e carica negativamente**: il polistirene è, in tal modo, capace di legare i fattori di adesione presenti nel siero.

Le piastre per coltura aderenti si distinguono in:

- **fiasche**: contenitori con imboccatura stretta, chiusa con un tappo a vite, utili in caso che le cellule debbano essere trasportate fuori del laboratorio
- **capsule petri**: semplici piastre di più facile manipolazione e più economiche delle fiasche.



Materiale monouso per le colture

Sistemi ventilati

- Petri dish (capsule petri)
- Piastre multi-wells (multi-pozzetto)

Sistemi chiusi

- Flask (fiasche)

Colture aderenti

- Le cellule aderenti crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile: a questo stadio si dicono **confluenti**.
- **A confluenza la crescita si arresta** e le cellule DEVONO essere staccate e trasferite in nuove piastre → **SUB-COLTURE**

Inibizione da contatto



Cellule confluenti in monostrato
(100 x magnification) L929 mouse fibroblast cells

Sub-culture

- L'adesione delle cellule al substrato dipende dalle **glicoproteine** e dalla presenza di **Ca⁺⁺** e di altri ioni.
- Per allestire le sub-culture si utilizzano protocolli per il distacco delle cellule dal substrato che prevedono:

➤ Soluzione contenente **EDTA** (chelante del calcio).

➤ Soluzione di **tripsina** (0,5% ÷ 0,01%; standard 0,25%)
Tale enzima è responsabile della proteolisi della matrice di adesione.
Va però ricordato che se usato a concentrazioni troppo elevate o per tempi troppo lunghi, demolisce anche le proteine presenti sulla superficie cellulare, con conseguenti danni funzionali alla cellula.

sospensione sub-culture



**Crioconservazione linea
cellulare**

CRIOCONSERVAZIONE

La criobiologia è lo studio delle tecniche di conservazione di materiale biologico a **temperature notevolmente inferiori allo zero, fino a -196°C** .

In condizioni criogeniche tutti i processi fisiologici di cellule, tessuti ed organi, sia di origine animale che vegetale, vengono temporaneamente bloccati in uno stato latente (per un periodo di tempo indefinito, se tali condizioni permangono) per poi riprendere in seguito allo scongelamento ed al ripristino delle temperature fisiologiche.

Metodiche di congelamento

Elemento chiave dell'intero processo di **CRIOCONSERVAZIONE** è la scelta di un'adeguata velocità di raffreddamento:

-deve essere sufficientemente lenta da **garantire la necessaria deidratazione**,
-al tempo stesso deve essere sufficientemente rapida da **limitare il tempo di esposizione** della cellula a concentrazioni tossiche di soluti e crioprotettore.

Esistono due protocolli principali di congelamento applicabili a cellule e tessuti biologici, in accordo con la **velocità di raffreddamento (*cooling rate*)** e il tipo e la concentrazione di **crioprotettore** utilizzati:

- il congelamento “lento”
- il congelamento “rapido” o “ultra rapido” (vitrificazione)

CRIOPROTETTORI

I crioprotettori più utilizzati per la crioconservazione delle cellule vengono suddivisi in due gruppi, in base alla loro capacità di diffondere attraverso le membrane cellulari:

1. ***crioprotettori permeabili*** come: 1,2-Propandiolo, Dimetil-solfossido (DMSO), Propilene Glicole (PG), Metanolo, Etilene Glicole (EG), Glicerolo;

-**STABILIZZANO LA STRUTTURA DELLE MEMBRANE**, agendo direttamente sulla loro organizzazione lipoproteica.

-**EVITANO LA FORMAZIONE DI CRISTALLI DI GHIACCIO** sostituendosi parzialmente e progressivamente all'acqua nell'ambiente intra ed extracellulare (formano estesi legami idrogeno)

Importante la loro velocità di diffusione transmembrana: più è rapida più velocemente si raggiunge un equilibrio osmotico e si evita l'eccessivo coartamento della cellula (danno osmotico). Inoltre si riduce il tempo di esposizione, limitando così gli effetti tossici che inevitabilmente queste sostanze producono sulla cellula.

-**PREVENGONO L'ESPOSIZIONE DELLA CELLULA AD ALTE CONCENTRAZIONI DI ELETTROLITI**, perchè LEGANO GLI ELETTROLITI impedendo un loro spostamento tra i due compartimenti intra che extracellulari

2) ***crioprotettori non permeabili*** rappresentati generalmente da polimeri o molecole di zucchero ad alto peso molecolare, come saccarosio, glucosio, raffinosa, trealosio, Polivinil Pirrolidone (PVP), ecc.

Sono rappresentati da sostanze con un **ridotto grado di tossicità**, INCAPACI DI ATTRAVERSARE IL BILAYER LIPIDICO di membrana.

Grazie alla loro struttura polimerica possono formare numerosi ponti idrogeno con l'acqua riducendone l'attività. **PROVOCANO UNA PARZIALE DISIDRATAZIONE DELLA CELLULA EVITANDO LA FORMAZIONE DI CRISTALLI DI GHIACCIO INTRACELLULARI durante le successive fasi del congelamento**; infatti umentano la concentrazione dei soluti extracellulari creando così un gradiente osmotico che richiama acqua all'esterno della cellula. In tal modo la cellula si riduce di volume prima del congelamento, e questo rappresenta una condizione molto favorevole per evitare la formazione di cristalli di ghiaccio.

Congelamento lento

Prevede l'esposizione delle cellule a concentrazioni relativamente basse (1,5 mol/l) di **crioprotettori permeabili** quali il **propandiolo** (PROH) o il **dimetil-solfossido** (DMSO), in associazione con un **ABBASSAMENTO DELLA TEMPERATURA EFFETTUATO A GRADONI**.

FASE DI RAFFREDAMENTO PIUTTOSTO VELOCE PER EVITARE ESPOSIZIONE PROLUNGATA: temperatura iniziale di circa 20-23 °C che si riduce progressivamente fino a -6 /-8°C con una velocità (o cooling rate) di circa 1°C/min.

SEEDING: anticipa e controlla la formazione di ghiaccio extracellulare a partire da un punto di nucleazione.

FASE DI RAFFREDAMENTO MOLTO LENTA (circa 1h) PER PERMETTERE LA DISIDRATAZIONE: Cooling rate di -0,5/-0,3°C/min. fino a circa -30/-35°C.

REPENTINA DISCESA (-50°C/min) della temperatura **fino a -196°C**.

STOCCAGGIO DELLE CELLULE direttamente in **AZOTO LIQUIDO**



SEEDING: creazione di un fronte di ghiaccio nella soluzione extracellulare, viene indotta manualmente toccando le pareti della *paillette* con una pinza di metallo previamente raffreddata a -196°C

STOCCAGGIO CELLULE CONGELATE



Congelamento ultra-rapido (*vitrificazione*)

Le cellule vengono **deidratate molto velocemente** e l'elevata viscosità della soluzione di congelamento causa la TRASFORMAZIONE DEI LIQUIDI IN UNO STATO FISICO DEFINITO "VETROSO", che **non comporta la formazione di ghiaccio**, principale causa di danno del processo di crioconservazione tradizionale.

Impiego di **CONCENTRAZIONI MOLTO ELEVATE DI CRIOPROTETTORE** (fino a 7 mol/l) associate a **GRADIENTI DI TEMPERATURA STRAORDINARIAMENTE ELEVATI**, ottenuti in genere trasferendo direttamente i campioni in azoto liquido.

Scongelamento rapido

Per lo scongelamento le cellule vengono prelevate dall'azoto liquido, (a volte lasciate a temperatura ambiente per alcuni secondi) e poi **immerse in H₂O o in una soluzione fisiologica sterile a circa 37°C per circa 40-60 sec.**

I successivi passaggi nelle soluzioni di scongelamento vengono effettuati allo scopo di **rimuovere gradualmente, almeno in parte, le molecole di crioprotettore** penetrate nella cellula per gradiente osmotico nella precedente fase di congelamento.

Protocollo di scongelamento

Soluzioni di scongelamento:

- Soluz. 1: PROH 1M + saccarosio 0,2 M + 30% FCS in PBS
- Soluz. 2: PROH 0,5M + saccarosio 0,2 M + 30% FCS in PBS
- Soluz. 3: Saccarosio 0,2 M + 30% FCS in PBS
- Soluz. 4: 30% FCS in PBS

Passaggi:

Soluz. 1	→	5 min.
Soluz. 2	→	5 min.
Soluz. 3	→	10 min.
Soluz. 4	→	20 min.

Conservazione delle cellule in azoto liquido

Subculture ripetute di linee cellulari possono portare ad aberrazioni genetiche. Per evitare tali inconvenienti si ricorre alla **conservazione in azoto liquido (-196°C)**.

Il congelamento in azoto liquido mantiene le cellule vive in completa **quiescenza** per anni.

Le cellule che vengono congelate devono essere in fase logaritmica di crescita o devono aver appena raggiunto la confluenza (solitamente ~70-80% confluenti).

Il congelamento viene fatto in presenza di terreno di crescita, siero e **agenti crioprotettivi** (es. DMSO) che favoriscono la deposizione di ghiaccio nell'ambiente extracellulare

Lo **scongelo** deve essere rapido: il campione viene trasferito in un bagnetto termostato a **37°C** per pochi minuti e poi si allontana l'agente crioprotettivo tramite lavaggi.