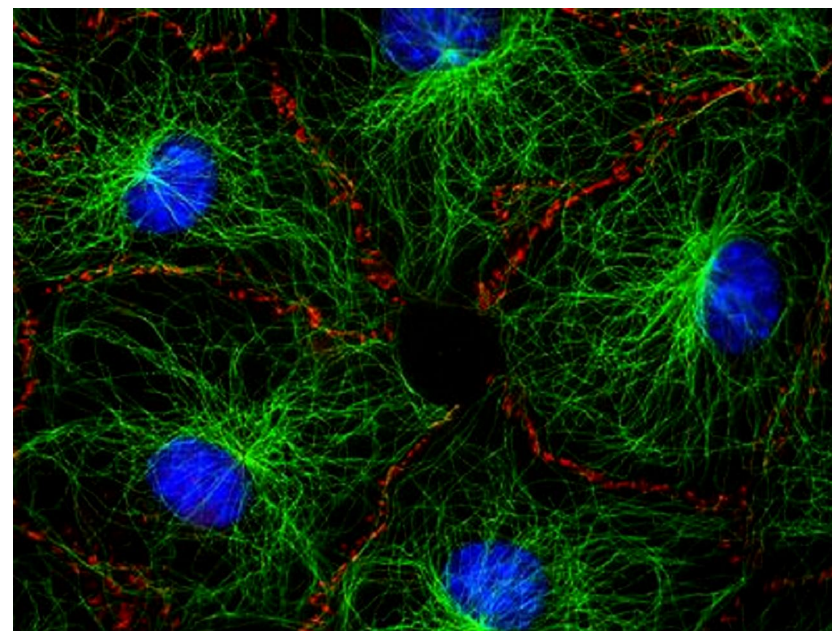


Formazione interdisciplinare su attività di sanità animale presso le
strutture di Biotecnologie e Diagnosi delle Malattie Virali

Introduzione alle Colture Cellulari

Parte prima

20 novembre 2018



Alessia Zepparoni



I pionieri della tecnica di coltura cellulare

1882-1885 -Sydney Ringer mette a punto la composizione di una soluzione salina, (Soluzione Ringer) efficace nel mantenere battito di cuore isolato dal corpo.

1885 -Wilhelm Roux mantiene in vita per alcuni giorni una porzione di tessuto neurale derivato dell'embrione di pollo, mantenendolo in una soluzione salina a temperatura controllata.

1907- Ross Harrison mantiene in coltura tessuto neurale di anfibio in un coagulo di linfa - dimostra origine assoni da singoli neuroni

1910-1923- Montrose Burrows e Alexis Carrel sviluppano un metodo di coltura per animali a sangue caldo (cane, gatto, pollo, ratto, cavia, tumori umani) usano coagulo di plasma + Sali + siero.

1940-1950-ampio sviluppo delle tecniche di colture cellulari in supporto alla ricerca in ambito Virologico e sviluppo vaccini es. vaccino anti-polio (Jonas Salk- introdotto in USA nel 1955).

1951- messa in coltura della prima linea cellulare stabilizzata umana, di origine tumorale: la linea HeLa (dal nome della prima paziente Henrietta Lacks).

1954 - Premio Nobel a Enders, Weller e Robbins per la scoperta del metodo di produzione del vaccino anti-polio utilizzando colture cellulari derivanti da rene di scimmia.



Linea cellulare HeLa

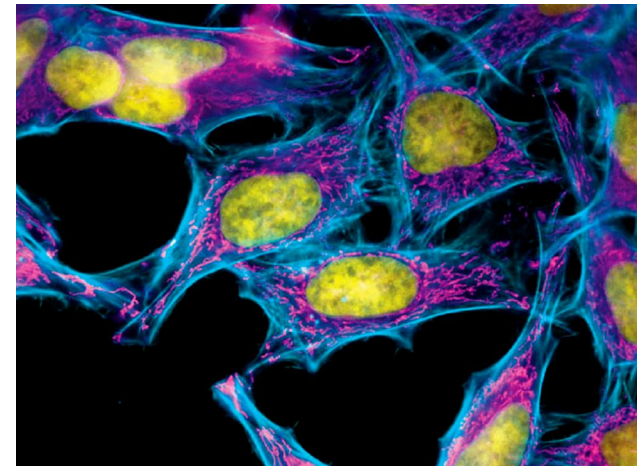
1951

Henrietta Lacks

Tumore della cervice uterina

Mutazione indotta dal Papilloma virus

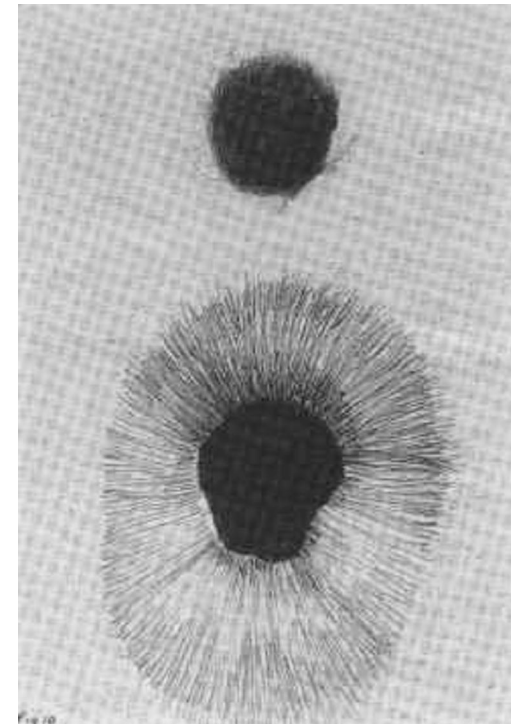
82 cromosomi



1954 - Rita Levi-Montalcini coltiva gangli sensoriali di pollo e scopre il fattore neurotrofico NGF.



1986 Nobel Prize
Rita Levi- Montalcini & Stanley Cohen



Nerve Growth Factor



Perché coltivare le cellule?

Ridurre la complessità tissutale:

Sistemi modello per lo studio della biologia e della biochimica di base, delle interazioni tra agenti patogeni e cellule, studi sull'invecchiamento e nutrizione.

Manipolare l'ambiente:

Studiare l'effetto di vari composti chimici su diversi tipi cellulari differenti.

Ricerca sul cancro:

Studio delle differenze tra cellule normali e cellule tumorali, ma anche la *trasformazione* delle cellule normali mediante radiazioni, virus o cancerogeni.
Studio degli effetti dei farmaci o di terapie antitumorali.

Modificare geneticamente le cellule:

Sintesi su larga scala di proteine terapeutiche/diagnostiche, produzione di vaccini, sviluppo di approcci di terapia genica.



Perché coltivare le cellule?

Produrre tessuti artificiali:

Studiare la combinazione di tipi cellulari e fattori molecolari per generare tessuti artificiali, come ad esempio, pelle, cornea, congiuntiva per trapianti, ...

Test di tossicità:

Si usano principalmente cellule derivate dal fegato o dal rene.

Diagnosi genetica:

Diagnosi prenatale, determinazione di alterazioni cromosomiche, mutazioni ecc.

Virologia:

E' stata una delle prime applicazioni delle colture cellulari animali, sono state utilizzate al posto degli animali da laboratorio per studiare la replicazione virale. Si utilizzano per l'analisi clinica, per l'isolamento e la determinazione dei virus patogeni.

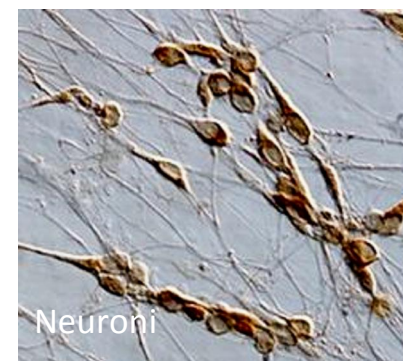
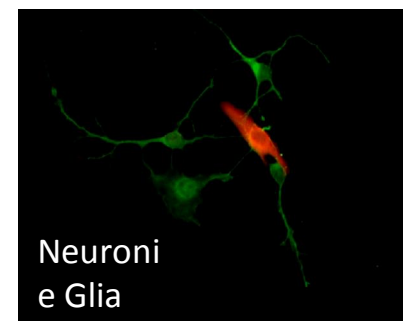


Colture cellulari

Linee cellulari primarie

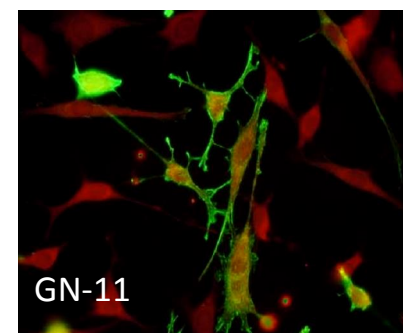
Isolate direttamente dal tessuto, sono cellule eterogenee, simili alle cellule del tessuto di origine.

Limitate capacità di proliferazione –senescenza.



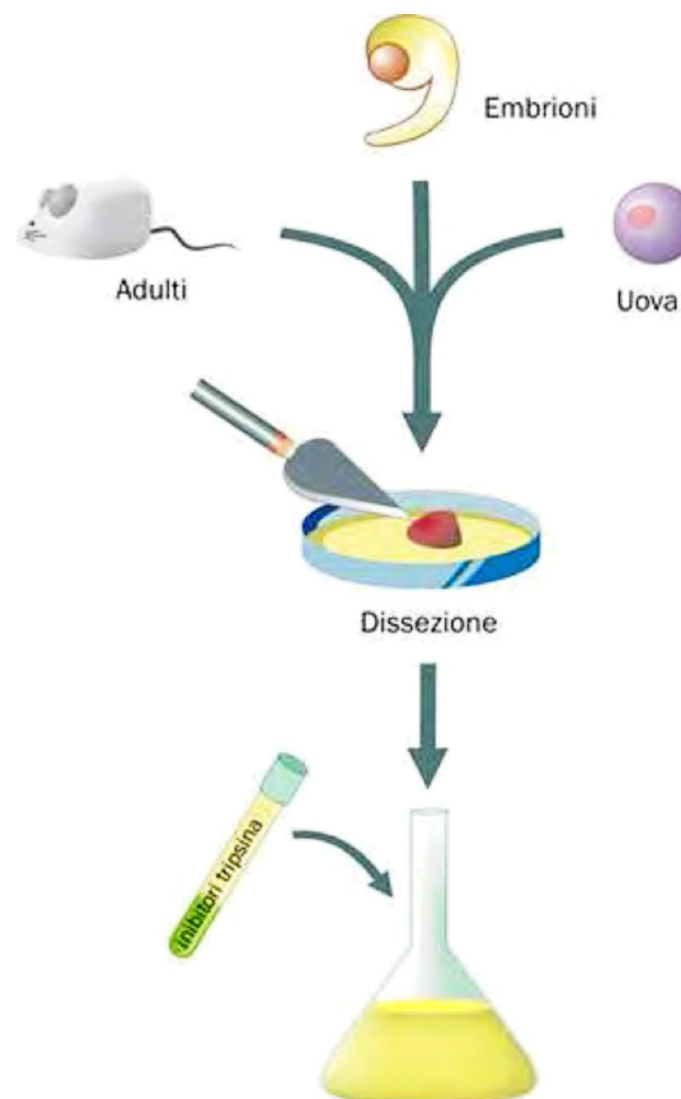
Linee cellulari continue

Ottenute per sub-coltura da colture primarie, possono essere immortalizzate attraverso mutazioni spontanee o indotte, hanno annullato il programma genetico della senescenza.

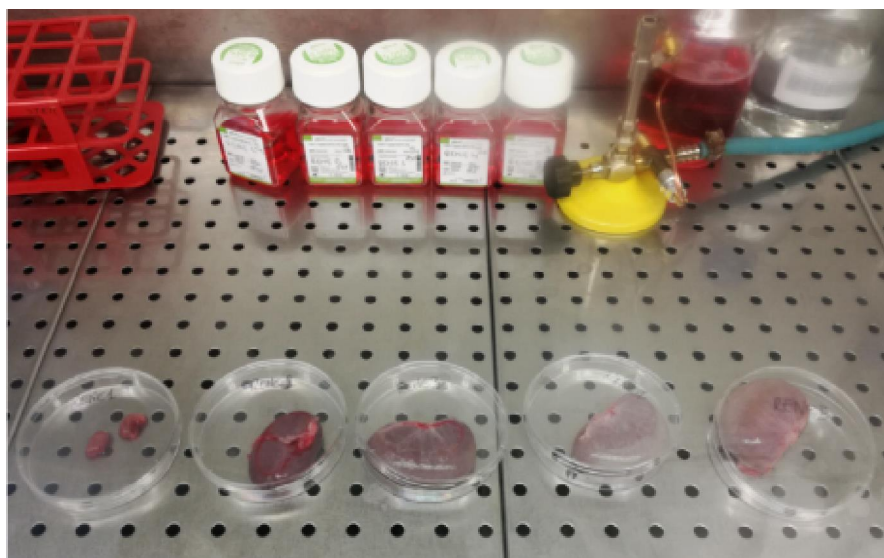


Colture primarie

1. Prelievo di una porzione di tessuto dal campione in esame.
2. Disgregazione meccanica.
3. Trattamento con enzimi proteolitici (tripsina, collagenasi...).
4. Aggiungere l' inibitore enzimatico.
5. Centrifugazione e lavaggi.
6. Semina in flask appropriate.
7. Incubazione.



Coltura Primaria da Rene Equino



Campioni d'origine



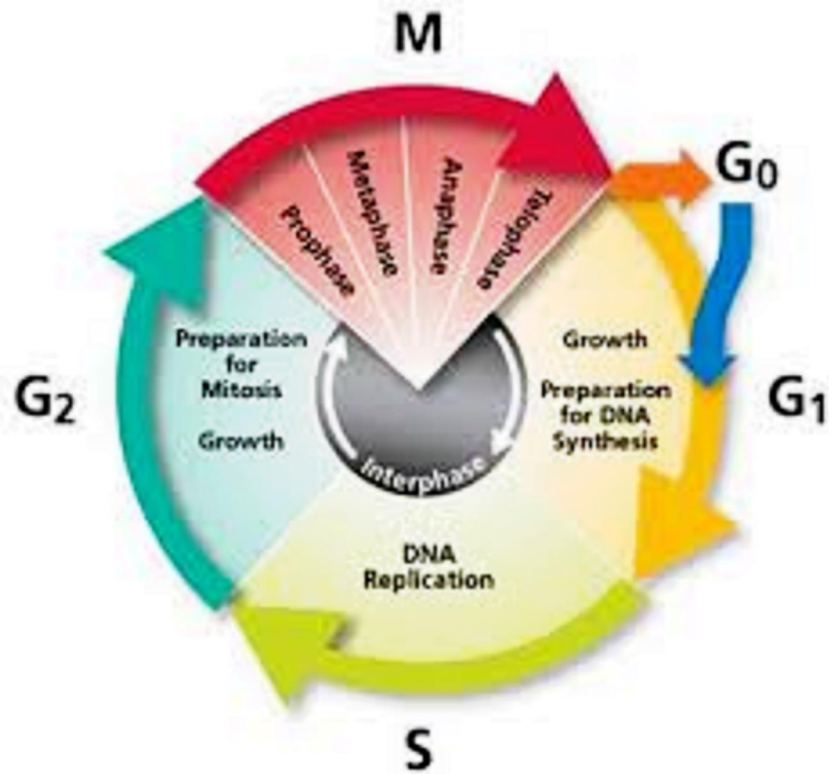
Allestimento digestione
enzimatica



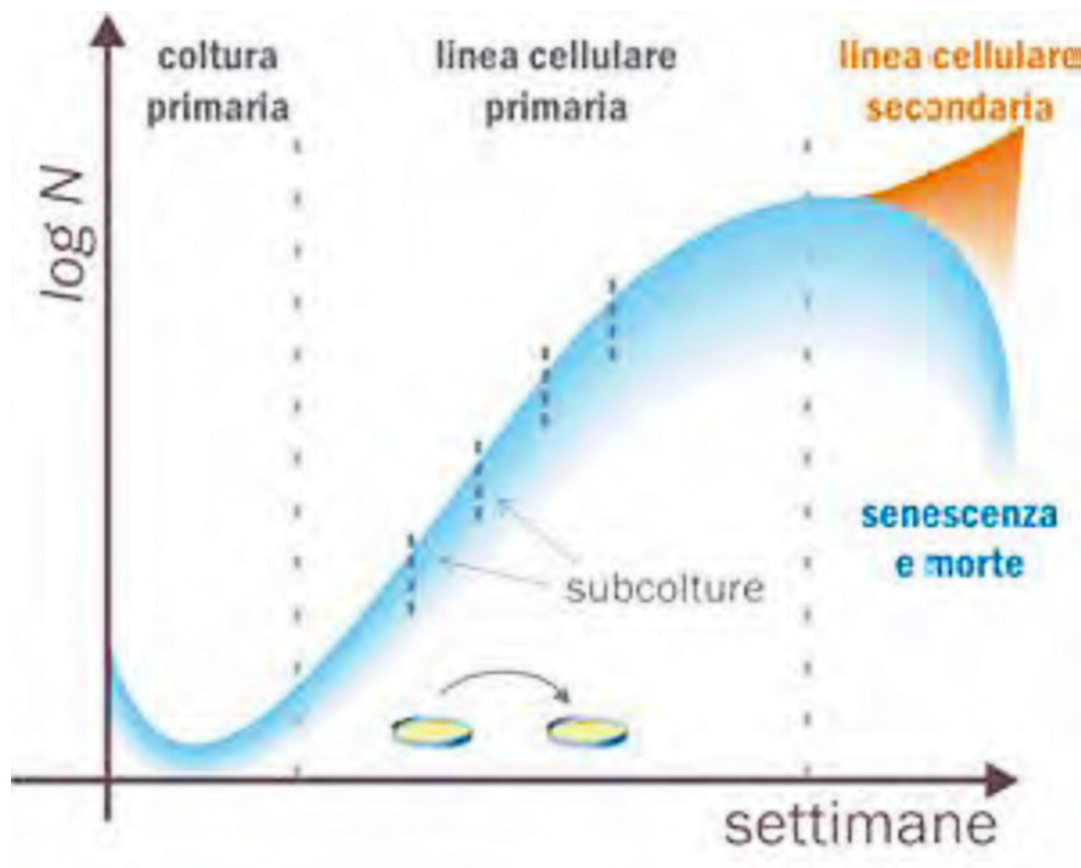


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Il Ciclo Cellulare



Curva di Crescita



Trasferimento genico

L'introduzione di DNA esogeno nelle cellule in coltura consente di studiare la funzione ed i meccanismi di controllo dei geni. Per facilitare l'ingresso del DNA esogeno nelle cellule sono stati sviluppati diversi metodi.

Essenzialmente il trasferimento genico nelle cellule animali si può realizzare:

“Trasferimento diretto del DNA:

Microiniezione, infezione virale

“Trasferimento indiretto del DNA:

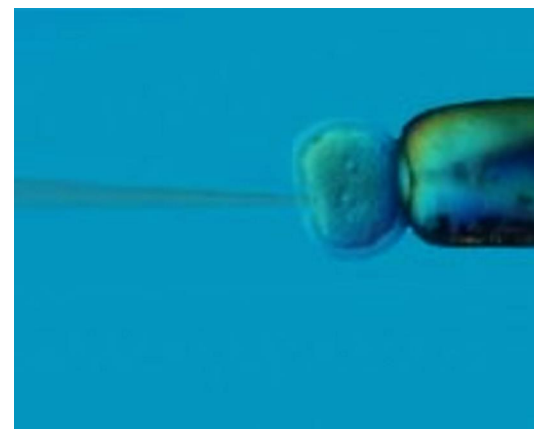
“Metodi Fisici: **Elettroporazione**

“Metodi chimici: **Liposomi, Tranferrina**



Microiniezione

Il metodo più sicuro per introdurre il DNA nelle cellule. Al microscopio ottico l'operatore può eseguire questa tecnica grazie all'ausilio di uno strumento, il micromanipolatore, che incrementa di 10 volte o più il numero di cellule che possono essere iniettate in un singolo esperimento. Si tratta di un complesso sistema che regola sia il movimento che la quantità di aria inspirata o espirata dalla pipetta e dal capillare che si utilizzano per microiniettare.



Infezione virale

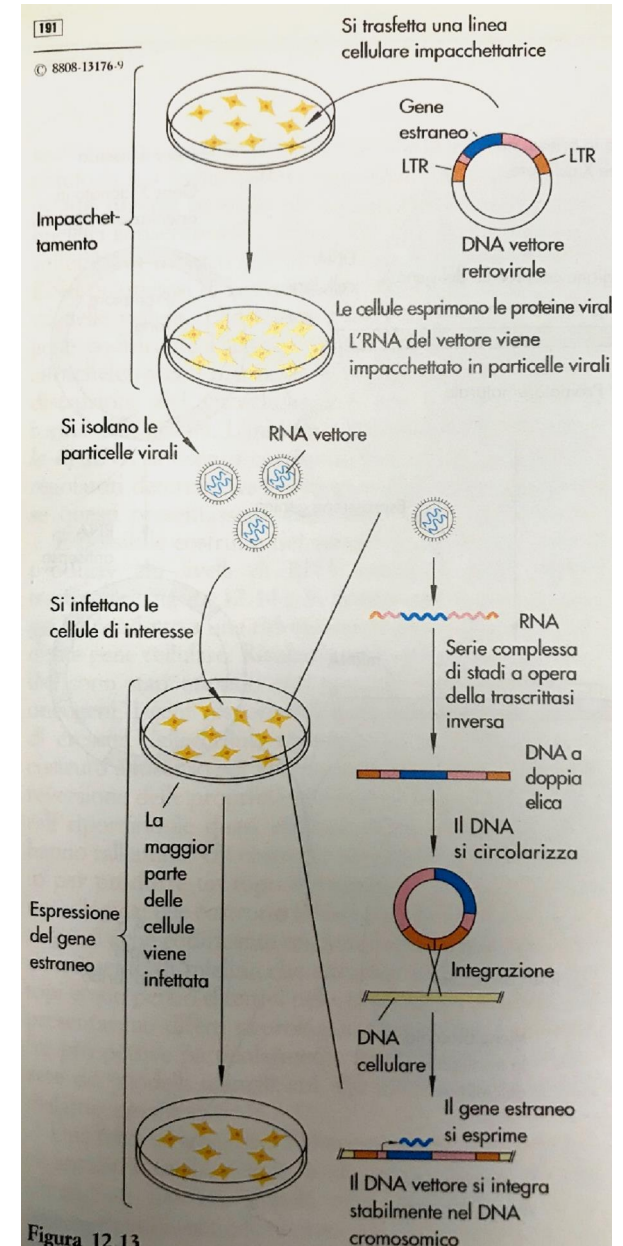
I retrovirus sono virus a RNA.

Il gene è clonato in un vettore virale retrovirale difettivo di molti geni virali.

Il gene solitamente è fatto esprimere sotto il controllo di un promotore forte localizzato nelle LTR.

Il plasmide ricombinante viene trasfettato in particolari cellule impacchettatrici che producono il virus con il gene d'interesse.

I virus così prodotti vengono utilizzati per infettare virtualmente qualsiasi tipo cellulare di mammifero.



Trasfezione transiente:

Pro:

Esperimenti a breve termine,
le cellule sono normalmente
raccolte 48-72 h dopo la
trasfezione,

Contro:

popolazione cellulare
disomogenea solo il 20-40%
di cellule contiene il DNA
esogeno

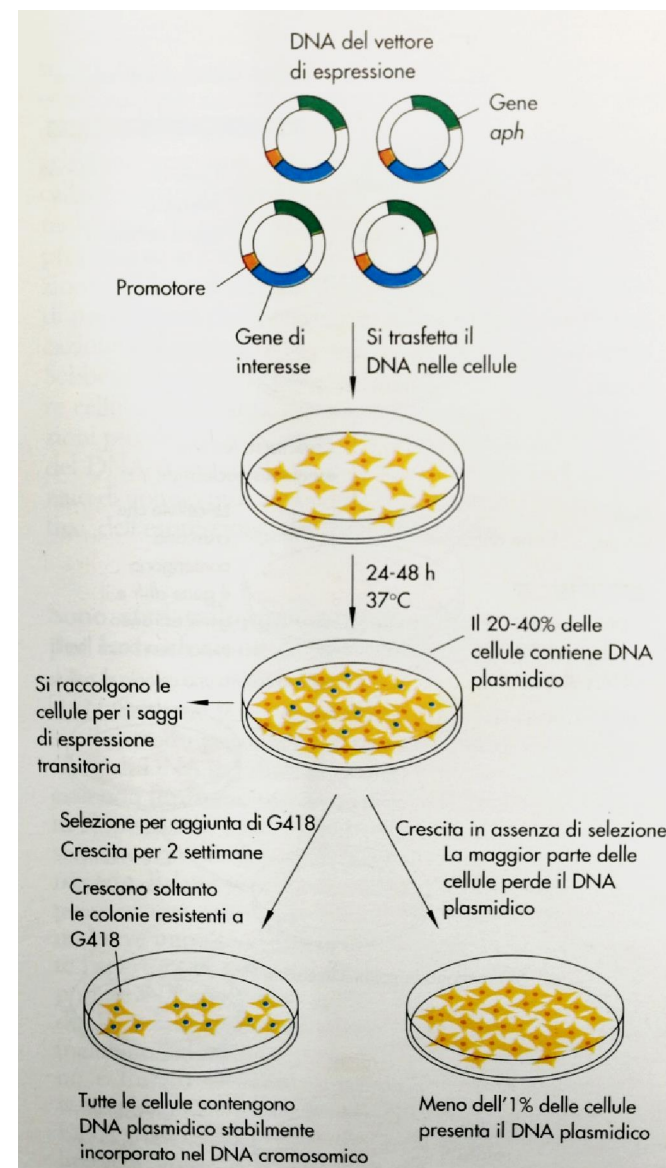
Trasfezione stabile:

Pro:

Per esperimenti a lungo termine.
Ppopolazione cellulare omogenea.
Possibilità di isolare e propagare
singoli cloni contenenti il DNA
esogeno.

Contro:

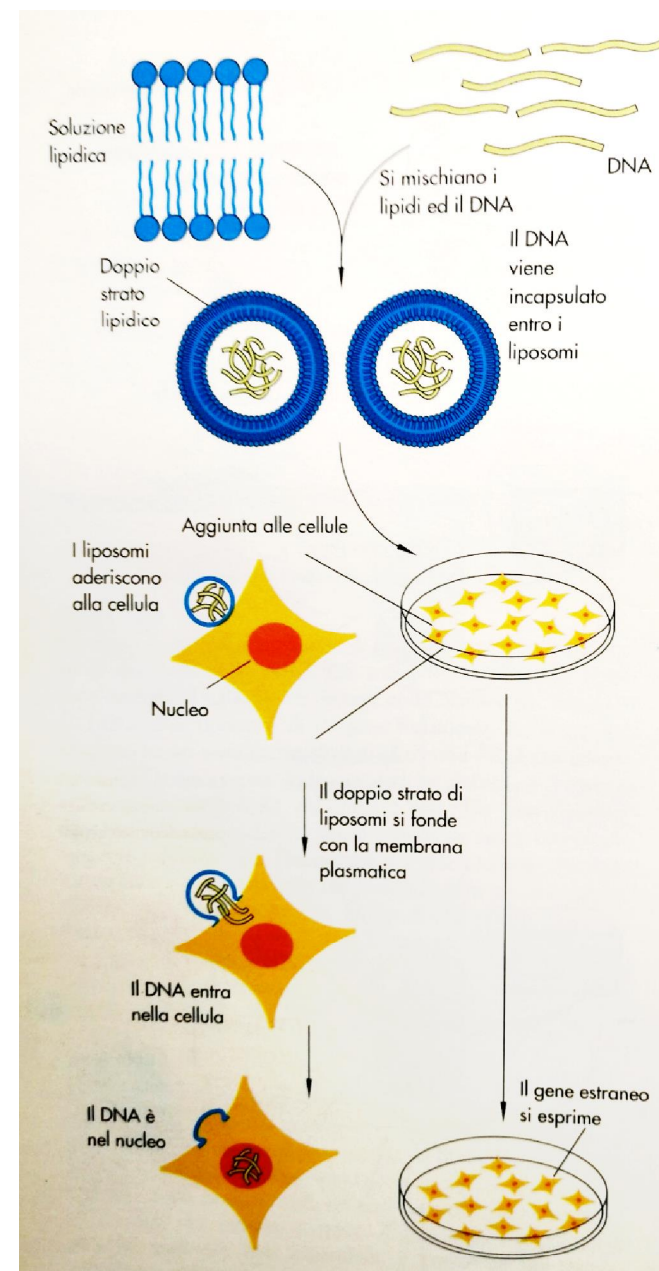
L'integrazione è casuale
Necessario marker di
selezione
Processo lungo, laborioso
e costoso.



Trasfezione mediante liposomi

Il Dna è incorporato entro vescicole lipidiche artificiali che si fondono spontaneamente con la membrana cellulare riversando il loro contenuto direttamente nel citoplasma.

In commercio esistono un gran numero di miscele diverse di lipidi, la cui efficienza varia a seconda del particolare tipo cellulare.



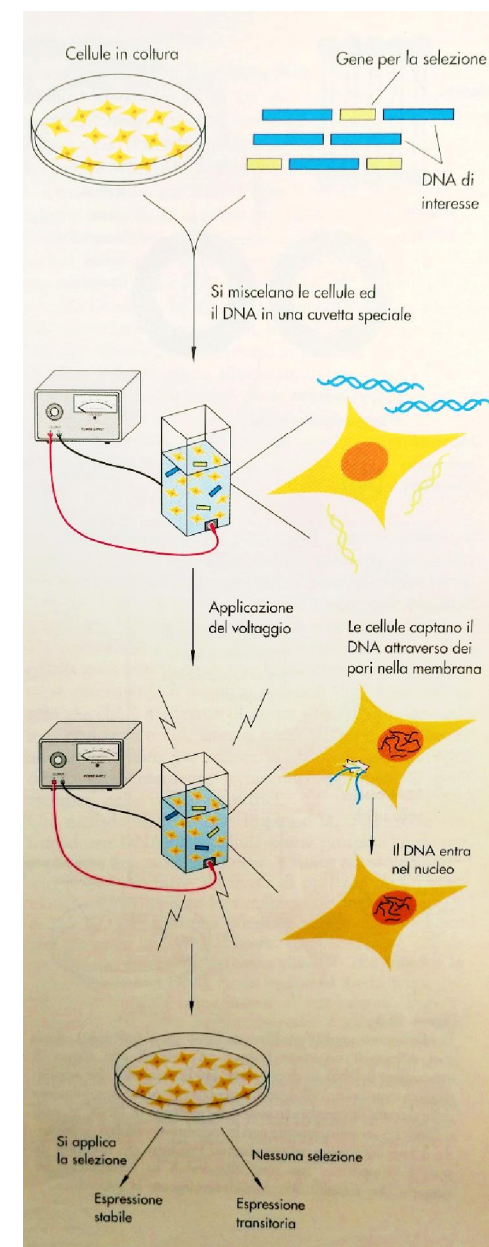
Elettroporazione

Le cellule vengono concentrate e mescolate con il DNA che deve essere trasfettato.

Vengono poste in una piccola camera con degli elettrodi connessi ad uno speciale alimentatore.

Attraverso gli elettrodi si induce un breve impulso elettrico che apre transitoriamente dei pori nelle membrane cellulari

Il Dna entra nel citoplasma.

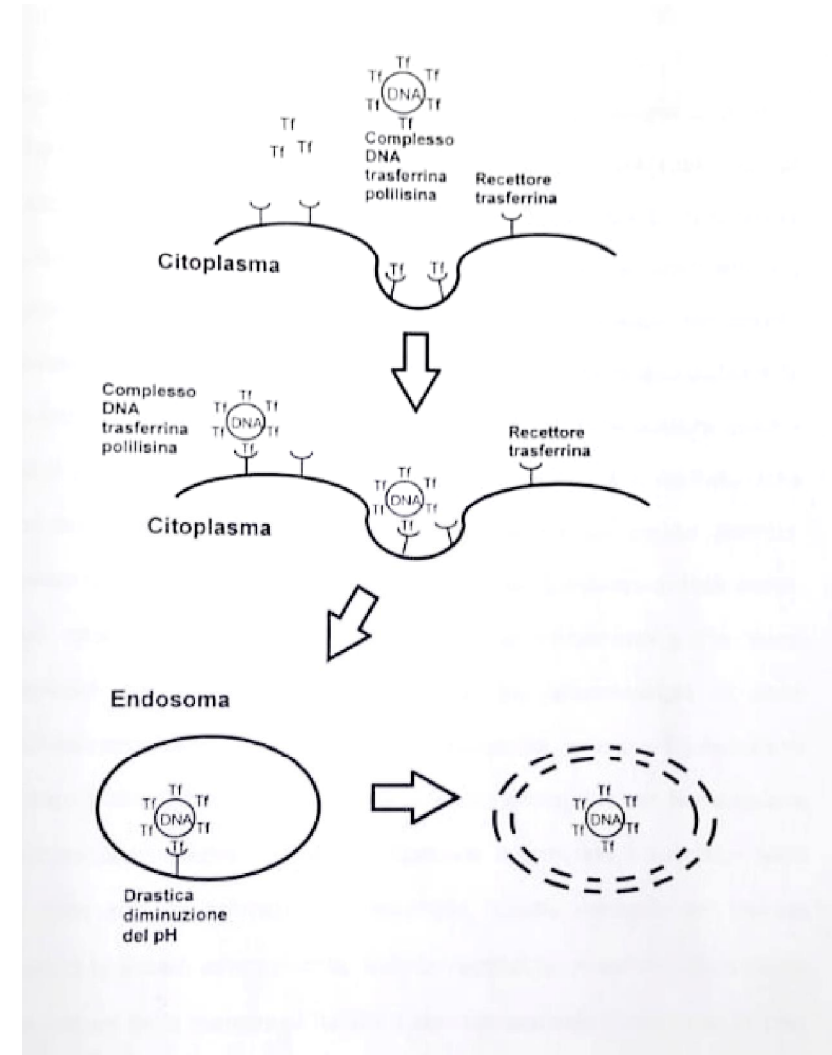


Transferrina

Il recettore per la transferrina è espresso ad alti livelli in un numero elevatissimo di isotipi cellulari.

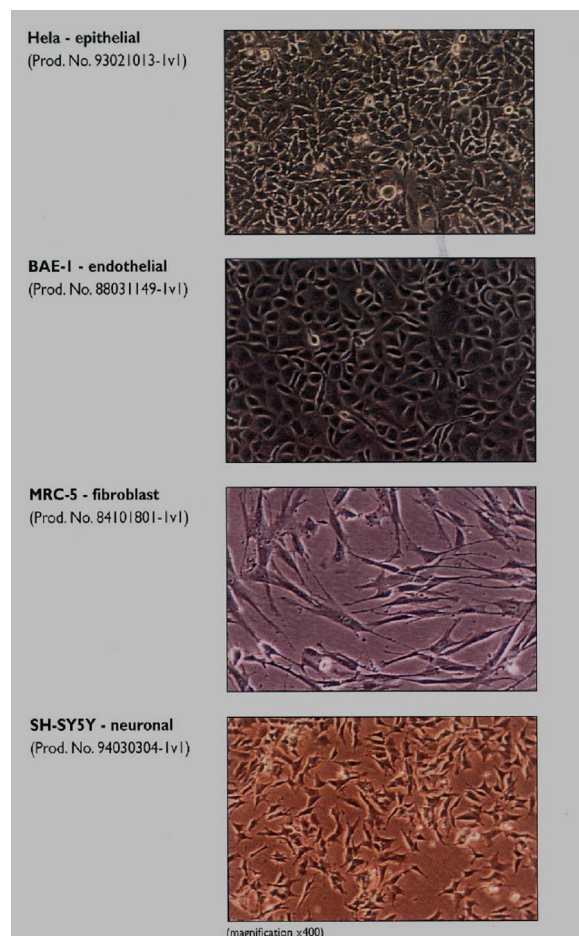
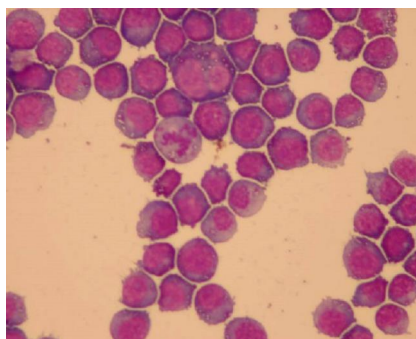
Il recettore dopo aver legato il suo ligando (transferrina), va incontro ad endocitosi e successivamente riespresso nel giro di mezz'ora.

La transferrina viene legata covalentemente a piccole catene di polilisina che permettono un legame stabile con il DNA



Le cellule possono crescere in
adesione e in sospensione, a
seconda dell'organo di
origine.

cellule Jurkat
(derivate da linfociti T)



Come coltivare le cellule

Substrati di adesione

Terreni di coltura

Temperatura

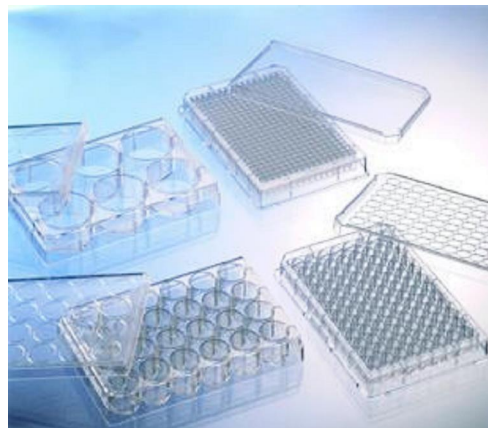
CO₂

Umidità



Supporti per coltivare le cellule

Polistirene
Biologicamente inerti
Non tossici
Trasparenti



Crescita delle cellule in terreno di coltura

Sali inorganici (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- ,...)

Glucosio

Amminoacidi essenziali

Vitamine del gruppo B

Indicatore pH

Glutamina

Siero

Antibiotici (penicillina/streptomicina)



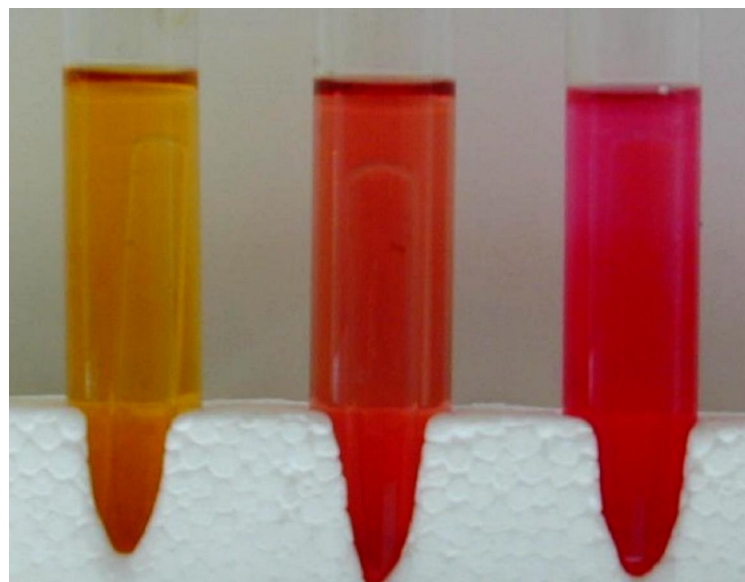
Siero di origine Bovino Fetale

- Introduce fattori di crescita ed ormoni;
- Veicola lipidi, ferro e molecole organiche;
- Favorisce interazioni cellule-substrato;
- Aumenta la capacità tampone;
- Inattivazione del complemento (56°C per 30').



Terreni di coltura controllo del pH

pH 7,2-7,5



Rosso fenolo

pH<6,8

pH>7,4



Parametri critici: Temperatura, CO₂ e Umidità

Condizioni standard (cellule di mammifero)

T 37°C

5% CO₂

Umidità relativa (RH) >98%



Sterilità

Utilizzo di terreni, reagenti e plasticheria sterile



Manipolare le cellule
in ambiente sterile



Distacco di cellule in adesione dal substrato

Protocollo:

1. Aspirare il terreno dalle piastre.
2. Lavare le cellule con PBS senza Ca_2^+ e Mg_2^+ .
3. Incubare le cellule in presenza di tripsina/EDTA a 37°C o RT.
4. Osservare le cellule al microscopio.
5. Favorire il distacco mediante agitazione.
6. Risospendere con il terreno completo e fare le opportune diluizioni.

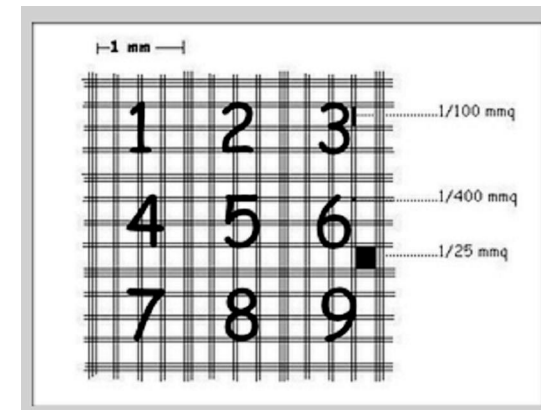
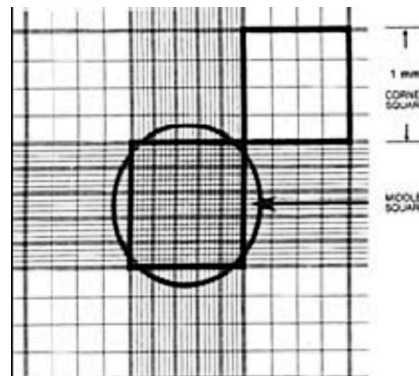
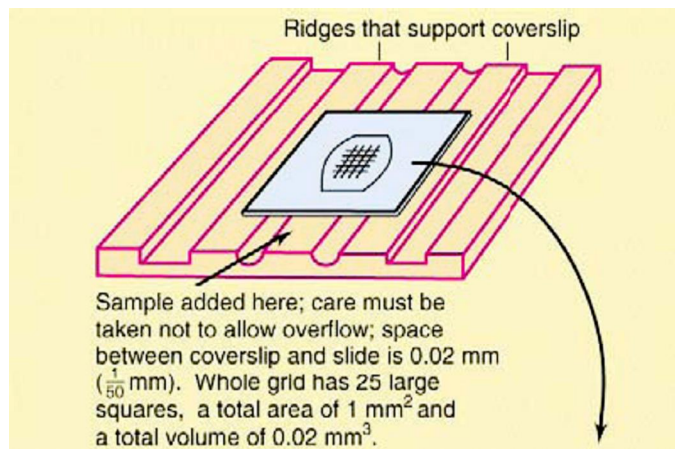


Conta delle cellule in adesione

Prima del conteggio si devono staccare le cellule dalla piastra e eliminare gli aggregati cellulari mediante trattamento enzimatico o chimico (es. tripsina-EDTA). La conta del numero di cellule in genere si effettua con la camera di Burker.

Questa è costituita da un vetro spesso, in cui è ricavata una camera capillare, la parete superiore della camera è costituita da un vetrino bloccato da due graffe laterali.

Al microscopio diventano evidenti una serie di linee ortogonali tra loro che definiscono una serie di aree e quindi, di volumi.





Protocollo:

1. Staccare le cellule con una soluzione di Tripsina–Edta
2. Fare una diluizione delle cellule 1/10 (1800 µl di PBS + 200 µl di sospensione cellulare +200 µl di tripan blue diluito 1/10)
3. Allestire la camera di Burker
4. Contare tutte le cellule distribuite nei 9 riquadri utilizzando l'apposito contaglobuli
5. Il valore ottenuto viene diviso per 9
6. Il risultato ottenuto espresso in 10^4 per ml (fattore di diluizione intrinseco alla camera), viene moltiplicato per 10 che è il fattore reciproco della nostra diluizione.
7. Il risultato finale viene quindi espresso in 10^5 per ml

Esempio:

cellule contate 110 $110:9= 12,2 \times 10^4$ $12,2 \times 10^4 \times 10= 12,2 \times 10^5$ per ml



Distribuzione cellule

POS DMV 012 NOR FAVN

30 ml di cellule BHK₂₁ a 4×10^5 cells/ ml

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

Esempio:

Conta con la camera di Burker $12,2 \times 10^5$ cells/ ml

$$30\text{ml} \times 4 \times 10^5 \text{cells/ml} = X\text{ml} \times 12,2 \times 10^5 \text{cells/ml}$$

$$X = 120/12,2 = 9,8 \text{ ml}$$

9,8 ml di cellule BHK₂₁ in 20,2 ml di terreno completo





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie
per
l'attenzione
e

