

**CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2024-2025**

**Corso di Biotecnologie Cellulari**

**Docenti:**

**Prof. Fiamma Mantovani**

**Dr. Alessandra Rustighi**

**Dr. Beatrice Anfuso**

# *Fiamma Mantovani*

*Prof. Associato di Biologia Applicata DSV  
Ed C11 st. 248 fmantovani@units.it*

## **DOCENZA:**

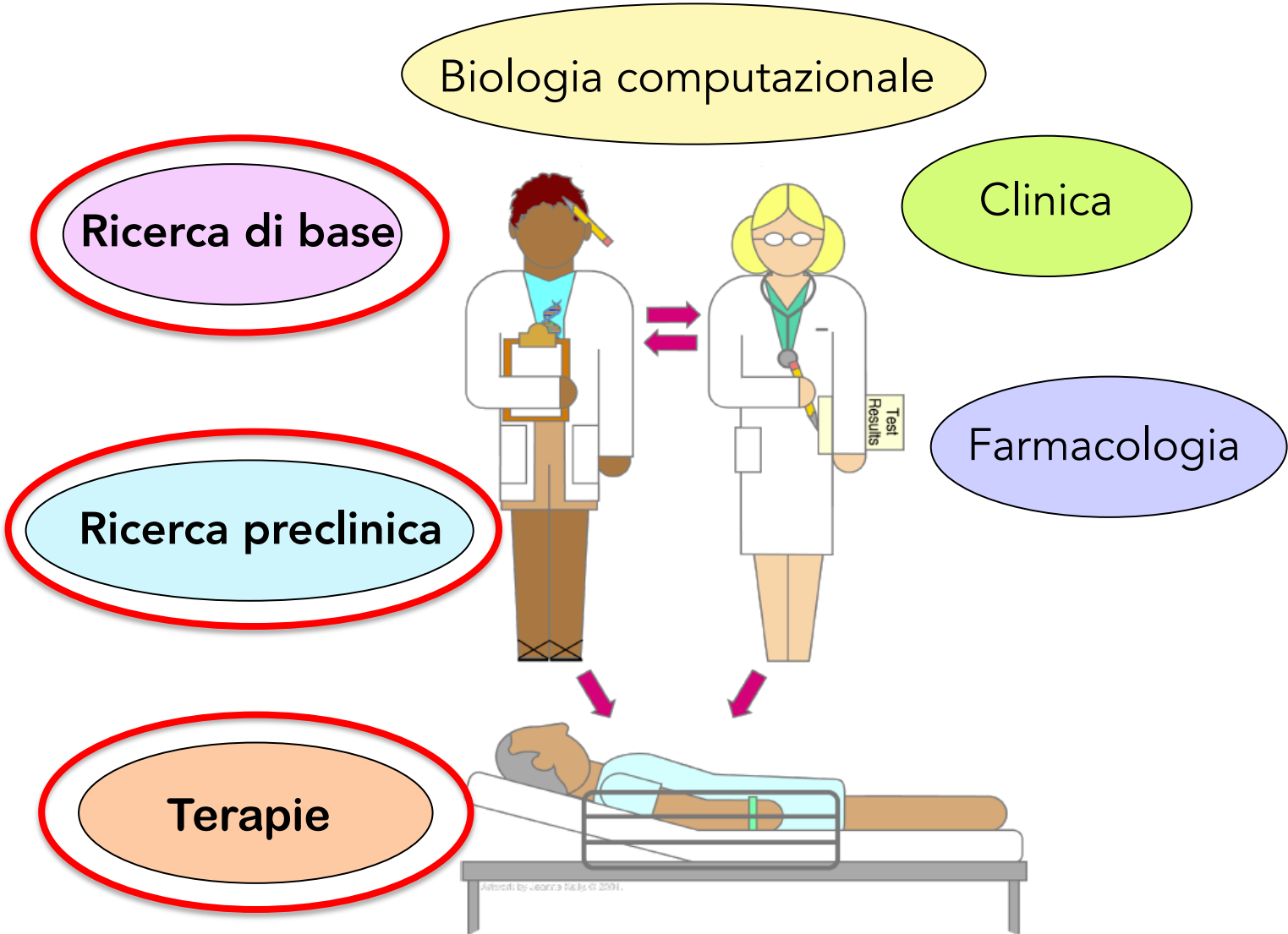
- LT in Scienze e tecnologie Biologiche – Cdl Biotecnologie Cellulari*
- LM in Genomica funzionale – Coordinatrice CdS – Cdl Biologia del cancro con laboratorio*



## **RICERCA:**

*Cancer cell signaling group ICGEB Area Science Park*

# Dove si collocano le biotecnologie cellulari?



## OBIETTIVO PRINCIPALE DEL CORSO

**acquisire**

le basi teoriche e le competenze pratiche

per **eseguire**

le diverse fasi di un **piano sperimentale**

che risponde a specifiche **domande scientifiche**

**Durante il corso gli studenti apprenderanno come organizzare una strategia sperimentale impiegando opportuni modelli e tecniche sperimentali e includendo gli opportuni controlli.**

# OBIETTIVI FORMATIVI

## SAPERE:

Acquisire **conoscenze** aggiornate di tipo **teorico e pratico /metodologico** sulle tecnologie cellulari impiegate nella ricerca biomedica e farmaceutica, in diagnostica e in terapia.

## SAPER FARE:

**Familiarizzare** con le tecnologie cellulari, saper **scegliere** le tecniche sperimentali appropriate e i **controlli** adeguati per affrontare specifici problemi scientifici.

Applicare il **metodo scientifico**:

- strutturare **domande** scientifiche e argomentare **ipotesi**.
- **pianificare** una strategia sperimentale per **verificare** un'ipotesi
- raccogliere **dati** sperimentali rilevanti e interpretarli

## **STRUTTURA DEL CORSO**

**24 ORE LEZIONE FRONTALE**

**36 ORE ATTIVITA' PRATICA IN LABORATORIO**

**Calendario delle lezioni ed esercitazioni  
reperibile in Moodle**

set	data	Teoria tutti	Lab gruppo 1	Lab gruppo 2
1	26-09	14-17 Lez 1	17-18	
	27-09	13-16 Lez 2		16-17
2	03/10		14-18	
	04/10	13-16 Lez 3	16-17	
3	10/10			14-18
	11/10	13-16 Lez 4		16-17
4	17/10		14-18	
	18/10	13-17 Lez 5		
5	24/10			14-18
	25/10	13-16 Lez 6	16-17	
6	07/11		14-18	14-15
	08/11		13-17	
7	14/11		14-18	14-18
	15/11		13-17	13-17
8	21/11		14-18	14-18
	22/11		13-17	13-17
9	28/11			14-18
	29/11			13-17
10	05/12	14-17 Lez 7	17-18	
	06/12		13-17	
11	12/12	14-17 Lez 8		17-18
	13/12			13-17
	19/12	Ripasso (?)		

## METODI DIDATTICI

- lezioni frontali convenzionali;
- attività di laboratorio individuali e di gruppo in laboratorio didattico

**È fortemente consigliata  
la partecipazione attiva  
a tutte le lezioni del corso**

**Supporti:** lezioni registrate disponibili in Teams  
Files pdf, links a risorse scaricabili e video didattici  
disponibili sulla piattaforma Moodle

**Non sono previsti libri di testo.**



## **PRE-REQUISITI**

- **conoscenze di biologia molecolare e cellulare**
  - **struttura e funzione degli organelli cellulari/via secretoria;**
  - **proliferazione e morte cellulare;**
- **conoscenze di biochimica/laboratorio di biochimica**
- **alcune conoscenze di fisica (es. fluorescenza)**

## VERIFICA DELL'APPRENDIMENTO

**ARGOMENTI:** Durante il corso gli studenti apprenderanno come organizzare una strategia sperimentale impiegando opportuni modelli e tecniche sperimentali e includendo gli opportuni controlli.

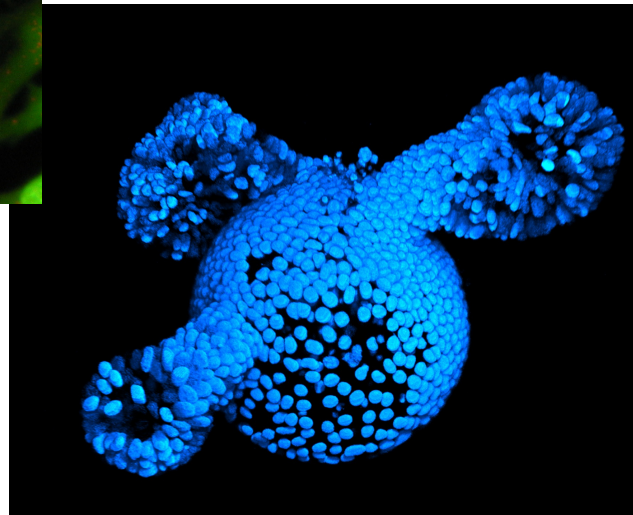
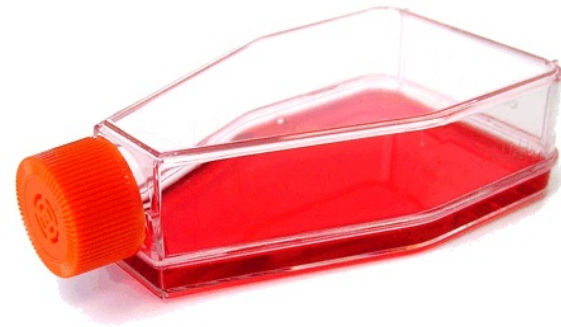
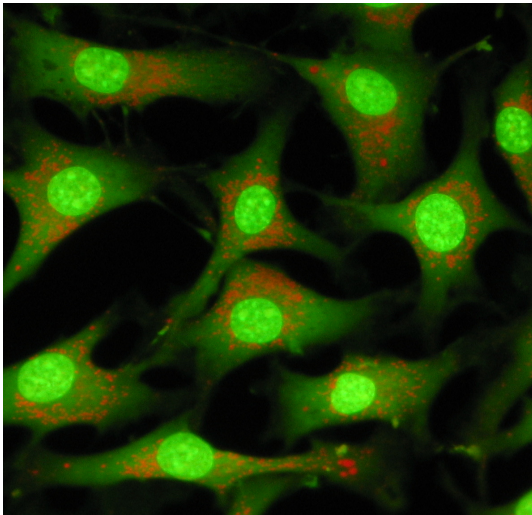
### **MODALITA':**

- 1) 9/10 = **COMPITO SCRITTO** della durata di 90 minuti, costituito da min. 3 domande aperte su tutti gli argomenti del corso, con lo scopo di verificare il livello di conoscenza degli **argomenti** del programma, il livello di padronanza del **linguaggio** specialistico e la capacità di sviluppare un ragionamento **applicando** le conoscenze teoriche a casi concreti. Nella **LEZIONE CONCLUSIVA** verranno forniti agli studenti **esempi** di domande e test di autovalutazione per la preparazione all'esame.
- 2) 1/10 = forma e contenuti del **QUADERNO di LABORATORIO** (in alternativa scrittura di un saggio per i non frequentanti)

# APPROCCIO SPERIMENTALE

---

Utilizzare le BIOTECNOLOGIE CELLULARI  
per la ricerca biomedica



L'utilizzo delle BIOTECNOLOGIE CELLULARI  
consente di **identificare e modificare**  
geni, proteine e processi responsabili  
di patologie



**Diagnosi**



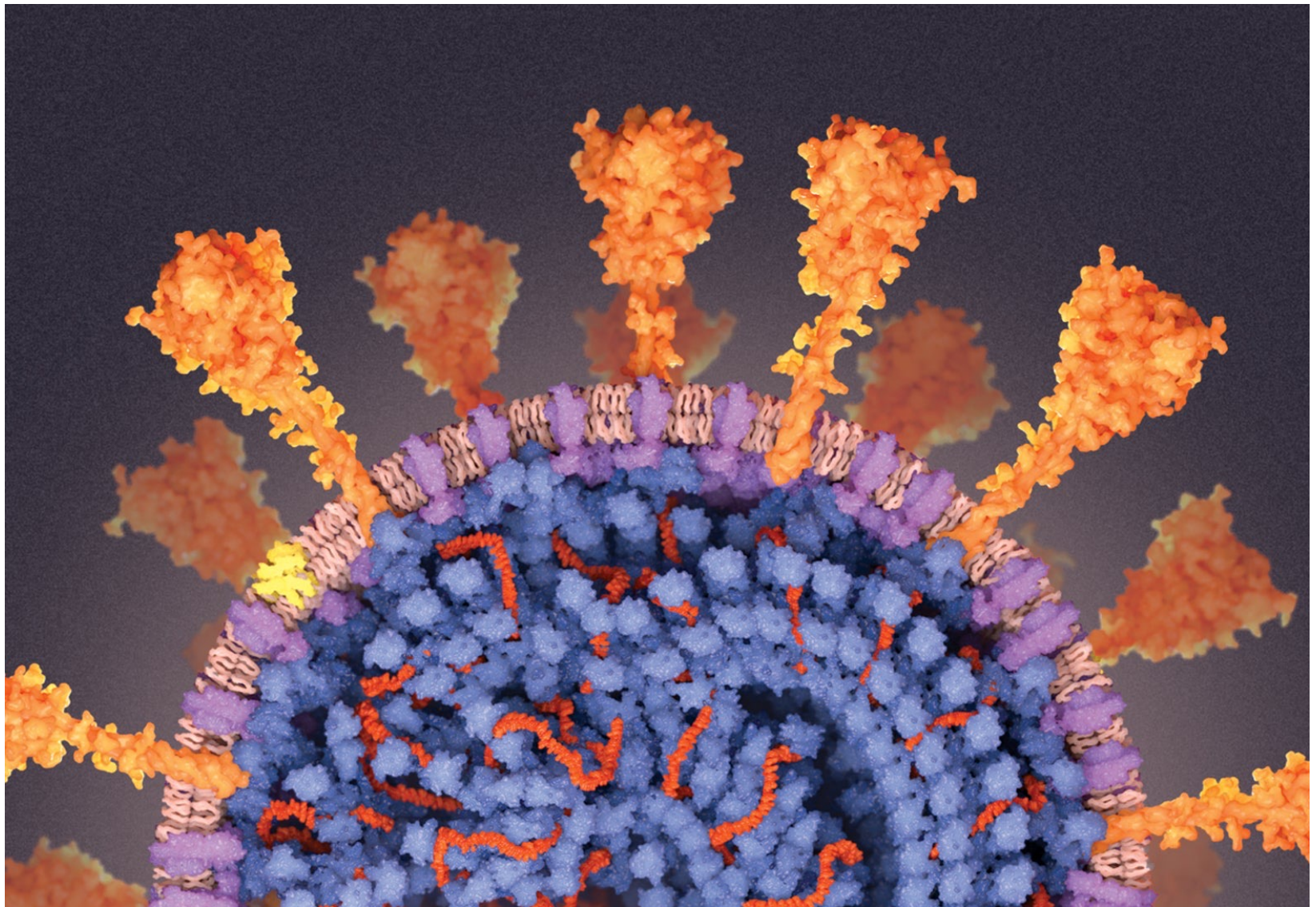
**Terapia**

# SVILUPPO DI UN PROGETTO DI RICERCA SPERIMENTALE

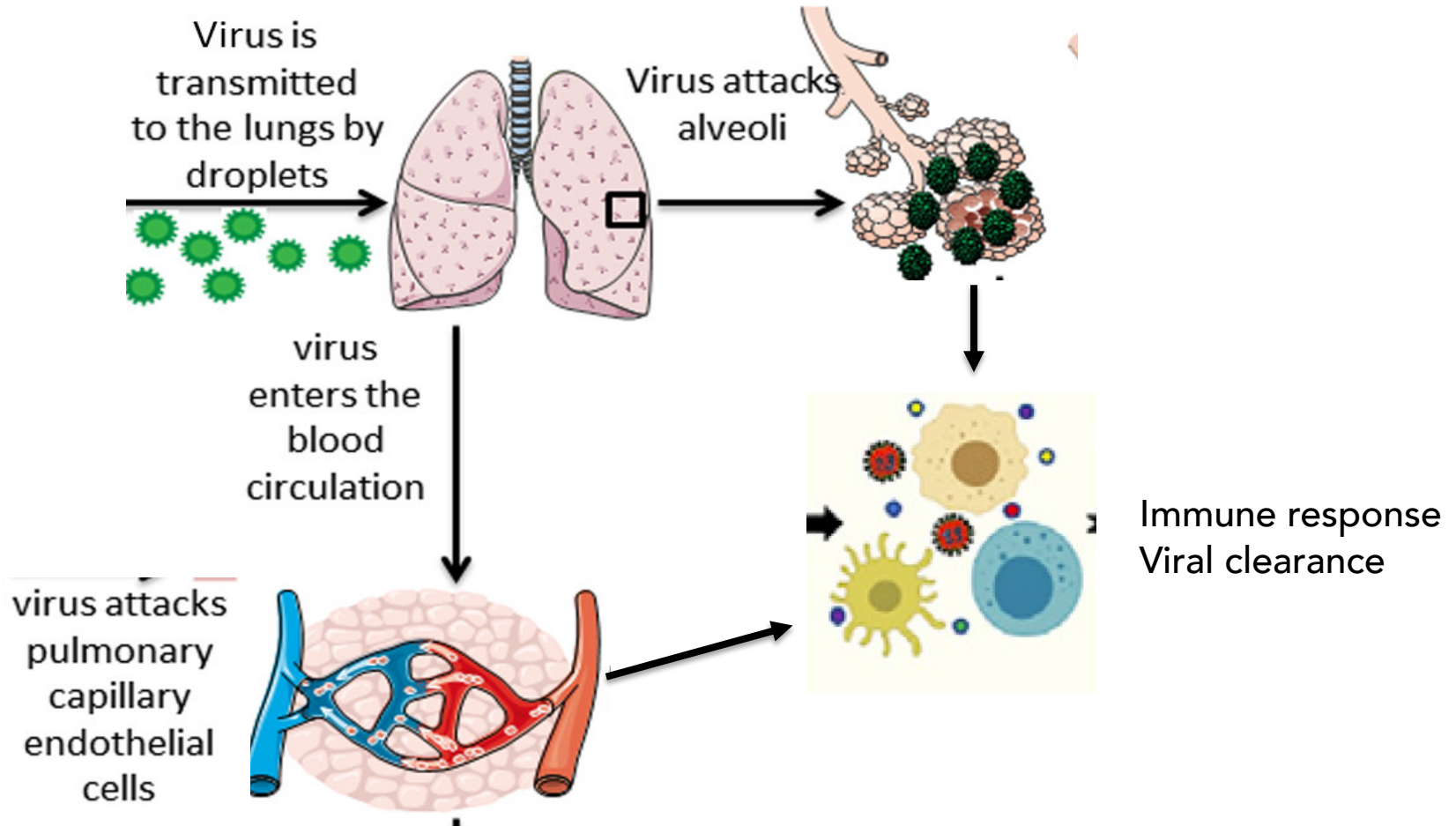
---

- 1) Stato dell'arte
- 2) Domande aperte
- 3) Ipotesi
- 4) Obiettivi
- 5) Approccio sperimentale
- 6) Risultati attesi
- 7) Rischi e possibili soluzioni

# STUDIO delle basi molecolari della COVID-19



# COVID-19: stato dell'arte



# COVID-19: sintomi

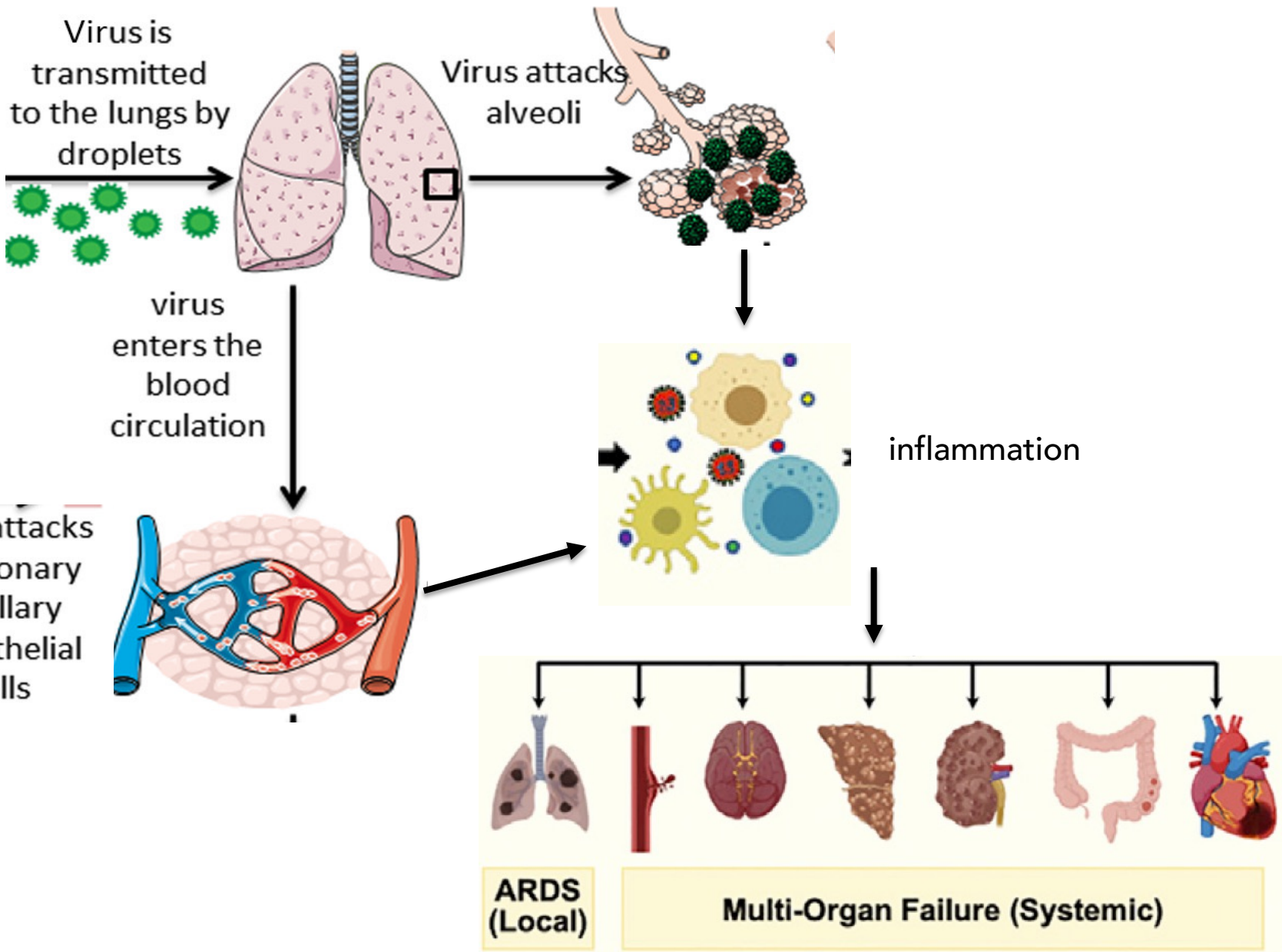
- Febbre;
- Tosse;
- Starnuti;
- Mal di gola;
- Debolezza;
- Affaticamento;
- Dolore muscolare;
- Dolori articolari;
- Mal di testa;
- Vomito e/o diarrea.

Sintomi quali anosmia o iposmia, disgeusia o ageusia sono stati definiti come tipici di COVID-19, anche se, con il prevalere delle più recenti varianti, questa specifica sintomatologia sembra essere meno frequente.

Nei casi più gravi si possono manifestare polmonite, sindrome da distress respiratorio e altre complicanze potenzialmente letali.



# COVID-19: stato dell'arte




# SVILUPPO DI UN PROGETTO DI RICERCA SPERIMENTALE

---

- 1) Stato dell'arte
- 2) Domande aperte
- 3) Ipotesi
- 4) Obiettivi
- 5) Approccio sperimentale
- 6) Risultati attesi
- 7) Rischi e possibili soluzioni

# COMPITO PER CASA:



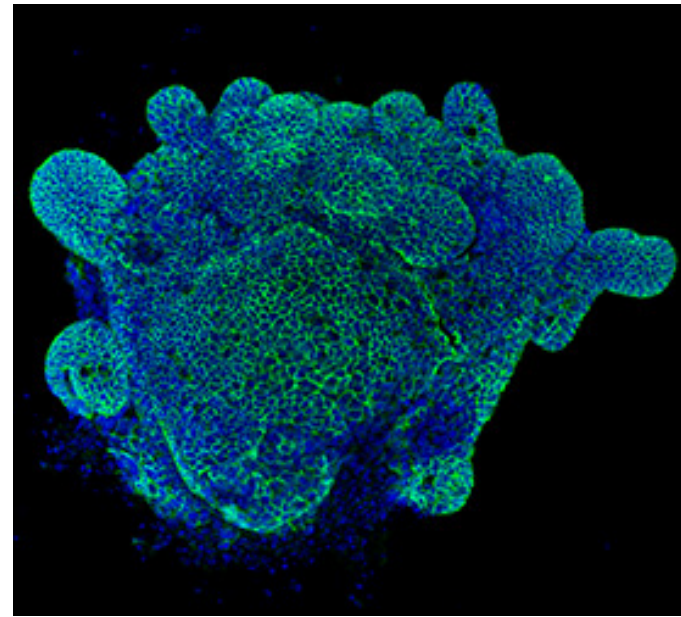
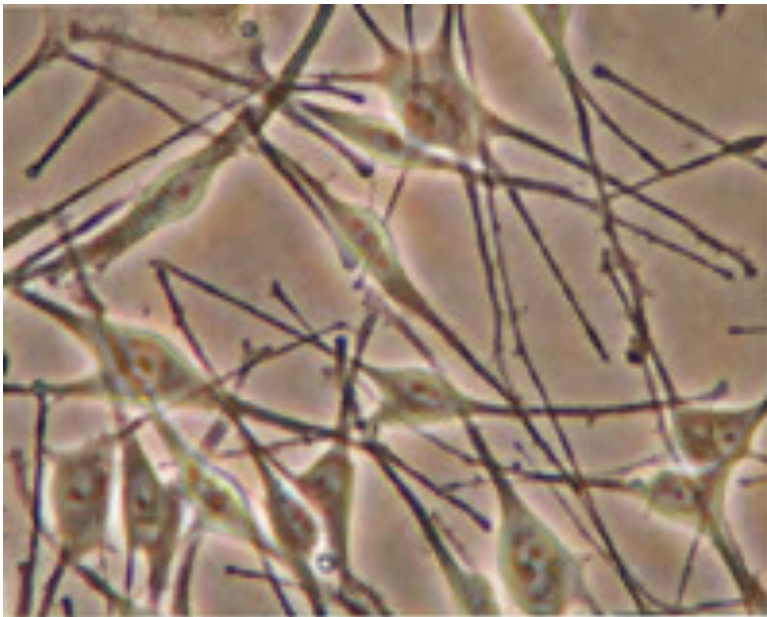
*Quali sono le  
domande aperte  
sulla COVID-19?*

**METODI E TECNICHE  
RICHIESTE PER LO SVOLGIMENTO DEL  
PROGETTO SPERIMENTALE**

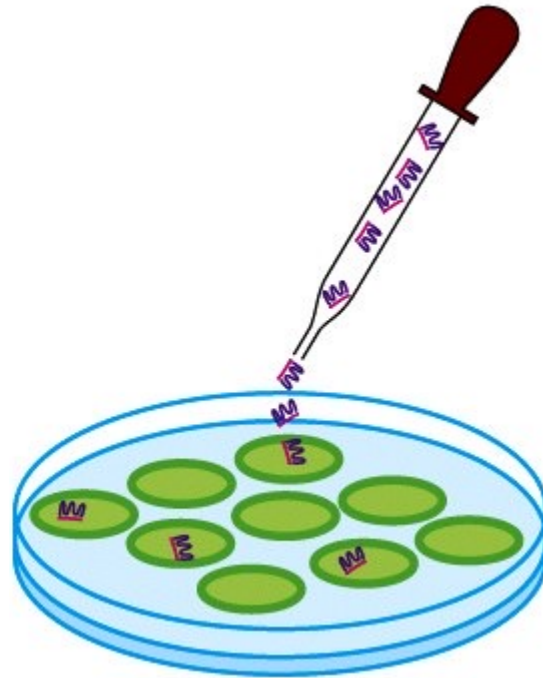
**1) IL MODELLO SPERIMENTALE**

# MODELLI BASATI SULL'UTILIZZO DI COLTURE CELLULARI IN VITRO

## TECNICHE E STRUMENTI PER GENERAZIONE, MANTENIMENTO ED ANALISI DI COLTURE CELLULARI



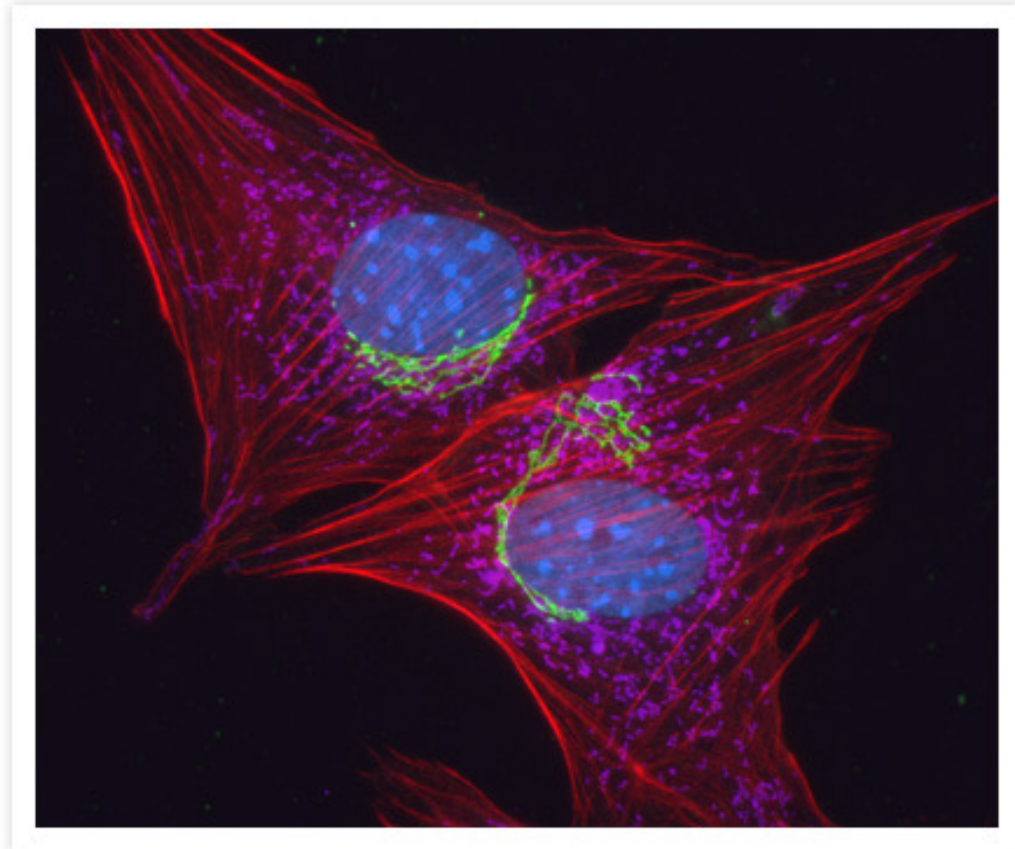
# TECNICHE E STRUMENTI PER la MANIPOLAZIONE DI COLTURE CELLULARI



Tecniche per l'inserimento di acidi nucleici in cellule in coltura

# ANALISI BIOCHIMICHE E FENOTIPICHE

1. Analisi della localizzazione subcellulare (teoria e pratica)
2. Analisi dell'interattoma di proteine (teoria)
3. Analisi di fenotipi cellulari - vitalità, chemiotassi, morte (teoria e pratica)



## NORME DI SICUREZZA



Le colture cellulari sono fonti di **potenziale rischio biologico**, in particolare **colture primarie** che derivano direttamente da **tessuti animali /umani**.

Durante il corso verranno utilizzate colture cellulari controllate per l'assenza di patogeni e cDNA codificanti per singole proteine (NON il virus nè il genoma virale)

Tuttavia, è buona norma apprendere subito come lavorare in sicurezza:

- usare **SEMPRE** i **guanti**
- dopo l'uso gettare **SEMPRE** tutto il materiale entrato in contatto con le cellule nei **contenitori dei rifiuti biologici per la sterilizzazione**



**Parte 1:**  
**ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:**

**LINK A VIDEO DIDATTICI**

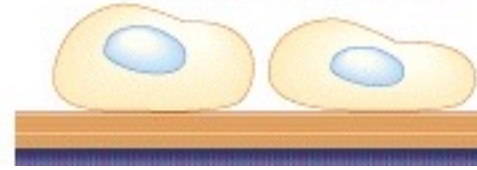
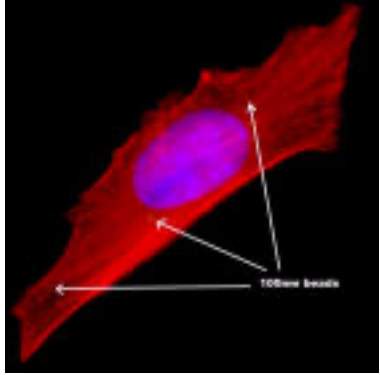
**Introduction to cell culture**

<https://www.youtube.com/watch?v=RpDke-Sadzo>

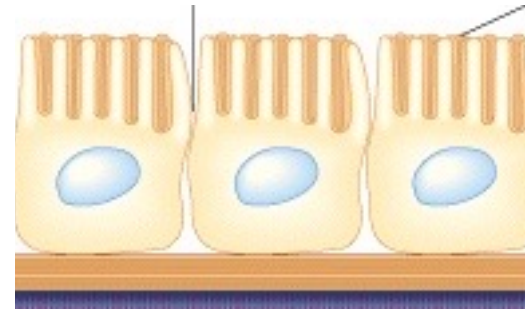
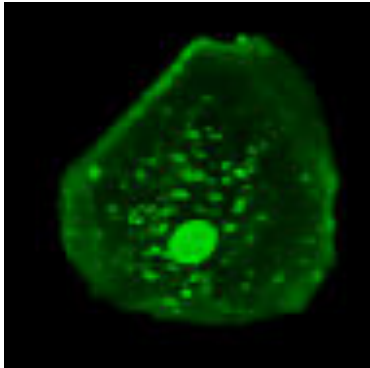
**Best practice for cell culture sterility**

[https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV\\_LuqJk](https://www.youtube.com/watch?v=nr1tV_LuqJk)

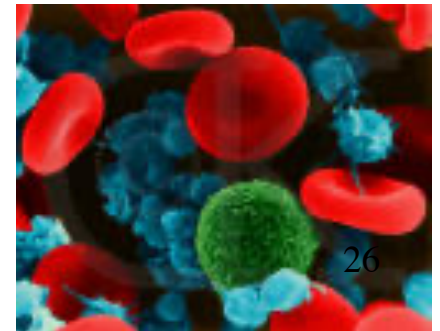
**Fibroblasti:** cellule derivate dal tessuto connettivo/endotelio  
aspetto **fusiforme**  
cellule **isolate**



**Cheratinociti:** cellule **epiteliali**  
aspetto **poligonale**  
colonie di cellule

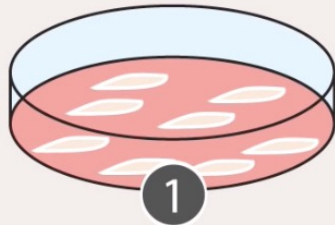


**Cellule del sangue/SI:**  
aspetto **tondeggiate**



## Principali condizioni di crescita cellulare

- in adesione 2D
- in sospensione
- colture 3D in matrici semisolide



Monolayers  
(Adherent cultures)



Free-floating  
(Suspension cultures)



3)- 3D

# Materiali e strumentazione:

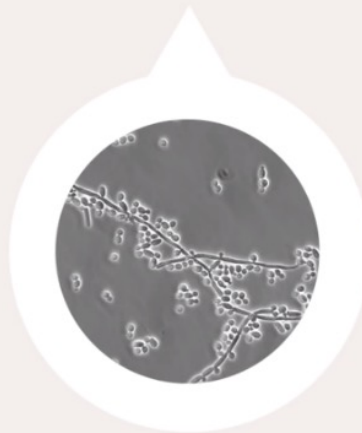
# Mantenimento della STERILITÀ

**assenza di microorganismi** inquinanti = batteri, lieviti, muffe, micoplasmi (archibatteri endocellulari), virus e protozoi.

## Microbial Contamination



Bacteria



Fungi



Mycoplasma

# Mantenimento della STERILITÀ

**assenza di microorganismi** inquinanti = batteri/micoplasmi, lieviti, muffe, virus.

## Trattamenti di materiale, strumentazione e reagenti:

- ✓ calore (autoclave, stufa a secco)
- ✓ irraggiamento con lampade germicide (UV, gamma)
- ✓ ultrafiltrazione (membrane 0.4-0.2  $\mu\text{m}$ )
- ✓ atmosfera sterile: cappe a flusso laminare
- ✓ disinfettanti per superfici
- ✓ uso di guanti
- ✓ antibiotici nel terreno di coltura
- ✓ BUONE PRATICHE

# TECNICHE DI STERILIZZAZIONE:

## 1) CALORE:

- vapore sotto pressione (autoclave). Il vapore è un ottimo conduttore di calore. Alla pressione di 1 atm il vapore raggiunge la T di 121 ° C alla quale le più resistenti spore batteriche vengono distrutte in 5-10 min. impieghi: soluzioni, plastiche, oggetti metallici.
- calore secco (stufe) richiede tempi e T maggiori rispetto all'autoclave, non essendo l'aria un buon conduttore del calore. Impieghi: vetreria, materiali anidri che possono essere alterati dal contatto col vapore.

## 2) RADIAZIONI

- UV: Lampade germicide: azione germicida legata alla capacità dei raggi UV di determinare mutazioni del DNA. L'efficacia è però limitata alle superfici esposte (radiazioni non penetranti)  
Impieghi = sterilizzazione dell'aria e delle superfici (es. cappa a flusso, intera stanza di coltura)
- Radiazioni ionizzanti (raggi gamma da  $^{60}\text{Co}$ ) determinano rotture e mutazioni negli acidi nucleici  
sia direttamente che attraverso radicali dell'O che si producono dalla scissione dell'acqua.  
L'efficacia è ottima (radiazioni penetranti) ma il costo è elevato  
Impieghi = derrate alimentari, strumentario in plastica (siringhe, cateteri, piastre, pipette di produzione industriale).

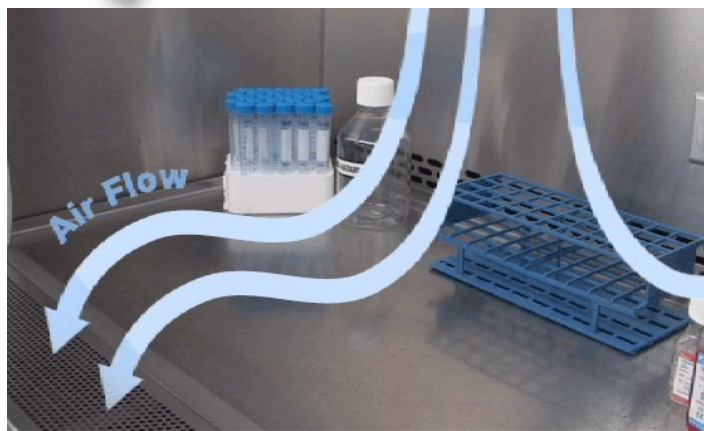
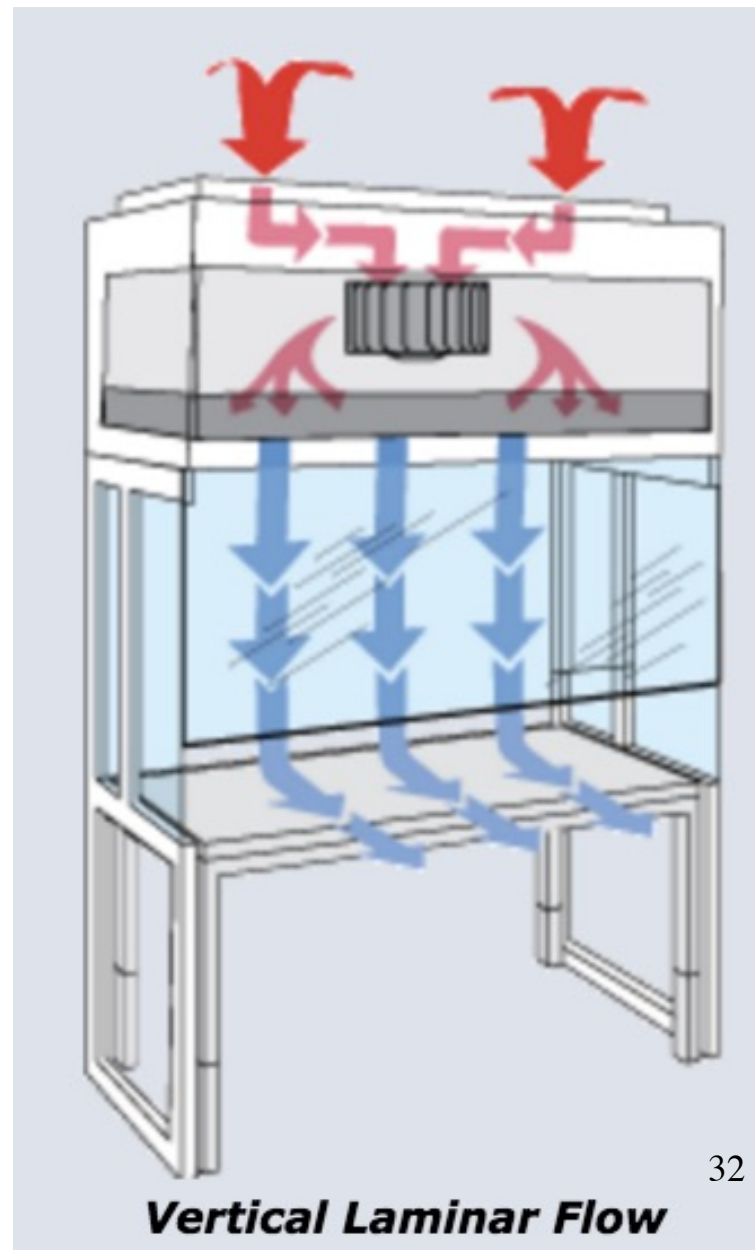
## 3) FILTRAZIONE

Filtri con pori di diametro inferiore a quello dei più piccoli batteri. molti virus per le loro piccole dimensioni passano attraverso i filtri sterilizzanti.

cellulosa (diametro = 0,22 micron)

polimeri sintetici (diametro = 0,22 micron)

# Le cappe per colture cellulari





## RECIPIENTI per COLTURE CELLULARI in adesione 2D

- Sterilità
- Garantire scambi gassosi
- Massima superficie di appoggio alle cellule
- Trattamento per la crescita in adesione

Capsule Petri



Bottiglie di Roux (flasks)



Piastre multipozzetto



## Trattamenti dei recipienti in plastica

La plastiche per colture cellulari può essere trattata in modo da **favorire l'adesione cellulare**. La plastica in questo caso esibisce cariche negative alla superficie. Le cellule secernono collagene e altri componenti della matrice, che aderiscono alla superficie carica negativamente e fanno da ponte tra questa e la cellula.

Al contrario, per crescita in sospensione di cellule che possono aderire, vi sono trattamenti di tipo diverso.

## INCUBATORI per colture cellulari



# INCUBATORI per colture cellulari

Crescita in condizioni controllate:

temperatura	37° C
pH = 7.4	5% CO <sub>2</sub>
umidità	saturazione H <sub>2</sub> O

Condizioni ottimali per la maggior parte delle cellule umane, ma possono variare a seconda del tessuto e dell'organismo!

pO<sub>2</sub> atmosferica = elevato stress ossidativo

## TERRENI DI COLTURA

Solitamente **SINTETICI**

devono:

- ✓ Fornire tutti i **composti necessari** alle cellule  
elementi per la **biosintesi**  
substrati per il **metabolismo**  
vitamine, minerali, ioni inorganici
- ✓ Mantenere **pH e osmolarità** entro limiti **fisiologici**

## TERRENI PER CELLULE DI MAMMIFERO

1. **Acqua bidistillata**
2. **Ioni per mantenere potenziali di membrana e la pressione osmotica, bicarbonato per mantenimento sistemi TAMPONE (in equilibrio con CO<sub>2</sub>)**
3. **Carboidrati:** 1 zucchero a 6 atomi di carbonio (glucosio)
4. **Aminoacidi:** 13 essenziali - spesso forniti 20
5. **Vitamine** come precursori di coenzimi
6. **Fosfocolina e inositolo**
7. **Elementi in tracce** (Ferro, Zinco, Selenio...)
8. **Antibiotici** (penicillina, streptomina)
9. **Indicatori di pH** (**rosso fenolo:**  
**rosso a pH=7, giallo a pH acido, viola a pH basico)**
10. **Fattori di crescita e differenziamento.**

## TERRENI DI COLTURA di comune utilizzo

- 1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- 2 Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI)
- 3 Ham's F12 Nutrient Mixture (F12)

NB: questi terreni sono ottimizzati per favorire la proliferazione cellulare, sono quindi **molto ricchi ma non** ricapitolano l'ambiente metabolico fisiologico (glucosio, amino acidi e derivati, lipidi, sali inorganici, elementi in tracce, vitamine).

Esistono terreni (es. Plasmex™) che ricapitolano l'ambiente metabolico fisiologico del plasma umano.

I terreni per colture cellulari devono avere un'**osmolarità controllata** (l'osmolarità è la pressione osmotica generata dai soluti presenti in 1 L di soluzione), per evitare che un ambiente **ipotonico** causi la lisi delle cellule (le cellule richiamano acqua per osmosi e si gonfiano fino a scoppiare.) Al contrario se l'osmolarità del terreno è troppo elevata, l'acqua fuoriesce e la cellula si disidrata.

Inoltre il mantenimento del **pH fisiologico** è essenziale per lo svolgimento di tutti i processi cellulari.

Sono necessari **nutrienti** e componenti per la **biosintesi**.

Ciascun tipo cellulare ha necessità specifiche per la crescita e quindi la scelta del terreno di crescita ottimale è critica per la buona riuscita degli esperimenti. In commercio esistono vari tipi di **terreni sintetici** che sono raccomandati per la coltura di determinati tipi cellulari.

Il **siero** è un materiale la cui composizione è parzialmente indefinita; contiene fattori che stimolano la crescita e l'adesione cellulare.

Il siero più utilizzato è quello ottenuto da feti bovini (FCS = Fetal Calf Serum).

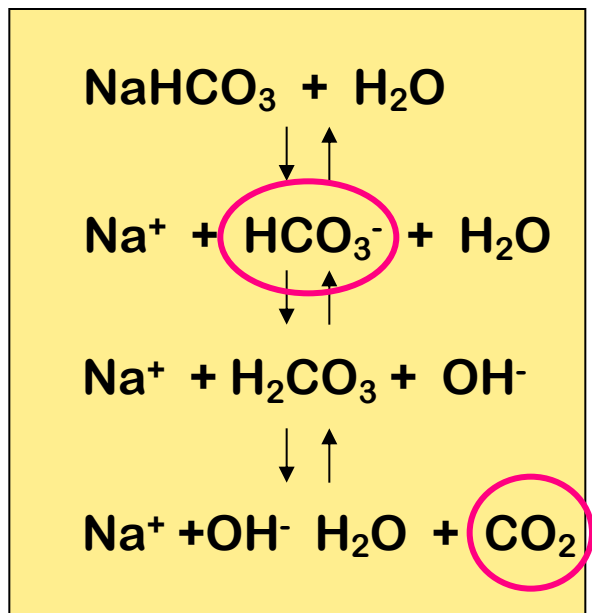


# CONTROLLO DEL pH

Il pH del terreno è fondamentale per la crescita cellulare, e tende ad **acidificarsi** a causa dei prodotti del **metabolismo** cellulare  
**pH FISIOLÓGICO: ~ 7,4** (varia a seconda del tipo cellulare)

## SISTEMA TAMPONE BICARBONATO

Bicarbonato di sodio nel terreno in equilibrio con CO<sub>2</sub> atmosferica



L'incubatore è collegato ad una bombola di CO<sub>2</sub>: l'immissione è controllata da una valvola e la **pCO<sub>2</sub> mantenuta a 5%**  
L'aumento eccessivo della pCO<sub>2</sub> comporta un'acidificazione del terreno (e viceversa)

## FATTORI DI CRESCITA e DIFFERENZIAMENTO

Le cellule necessitano di sostanze che stimolano la crescita e la proliferazione cellulare (**fattori di crescita**) o il differenziamento.

Si possono aggiungere al terreno cocktails di **fattori purificati**, ma nel caso di cellule di derivazione tumorale si usa comunemente il **siero fetale bovino (FCS)**.

In assenza di GF le cellule NON proliferano.

Se il terreno **NON contiene fattori: basale o di mantenimento**

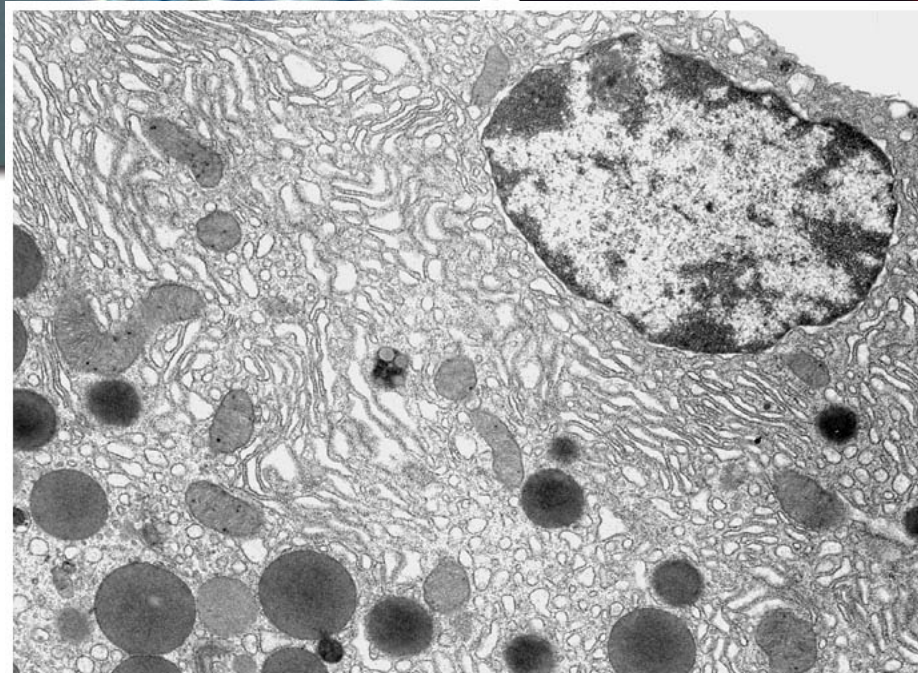
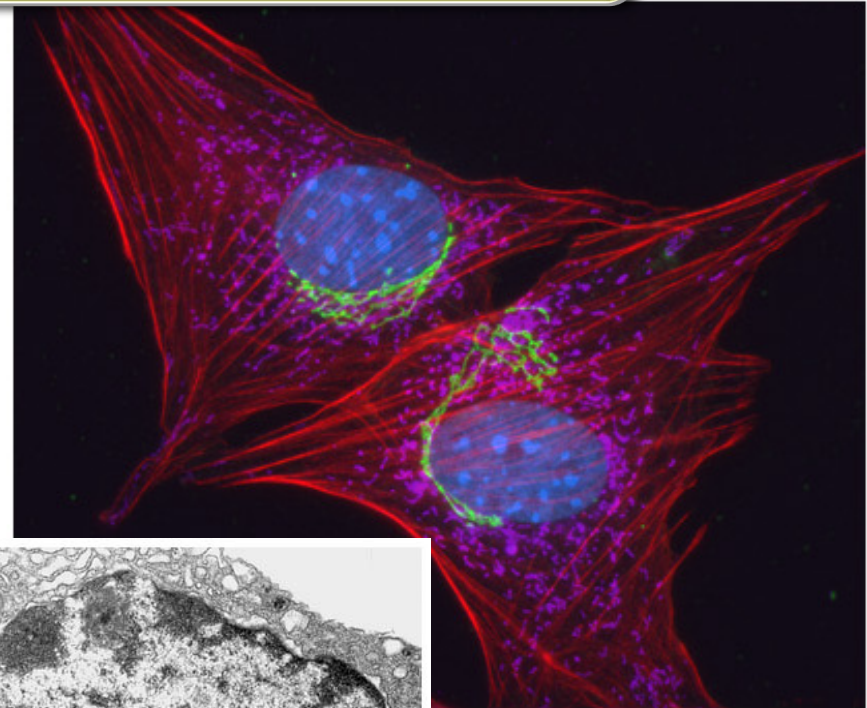
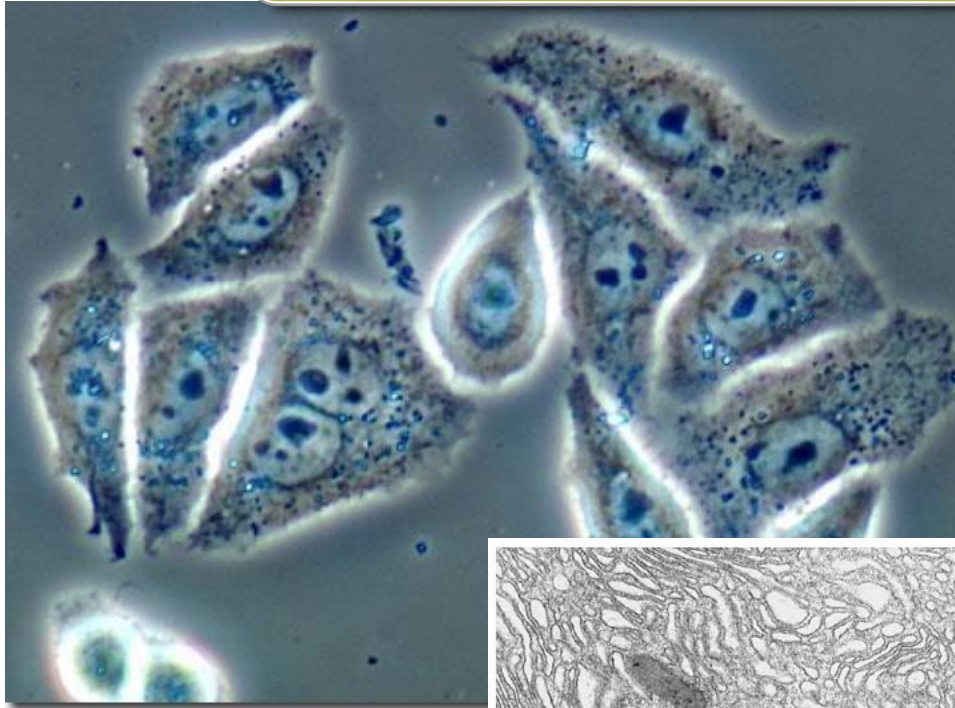
Se il terreno **contiene fattori: completo o di crescita**

# CRIOCONSERVAZIONE

Le cellule vengono **CONSERVATE** in **AZOTO LIQUIDO** (77K: -196 ° C)  
in appositi **CONTENITORI** detti **DEWAR**



# OSSERVAZIONE DI CELLULE IN COLTURA: DIVERSI TIPI DI MICROSCOPIA



cellule di  
mammifero:  
**10-100 micron**

# OSSERVAZIONE DI CELLULE IN COLTURA: MICROSCOPI

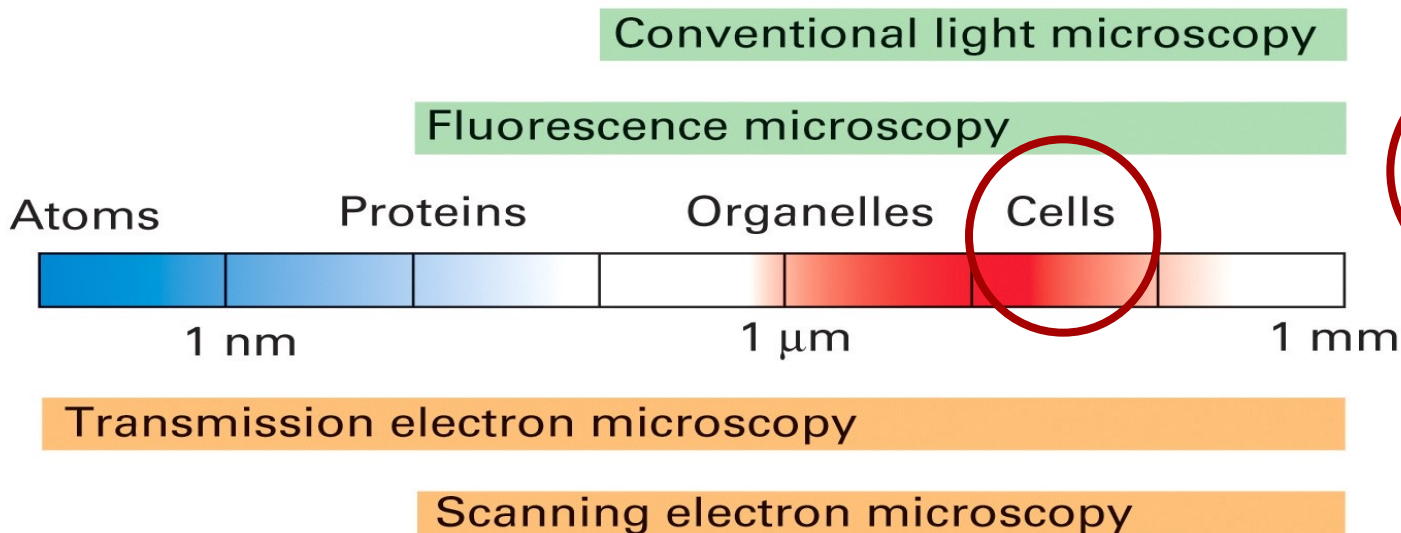


**INGRANDIMENTO:** prodotto dell'ingrandimento delle singole lenti utilizzate nel percorso ottico (obiettivo x oculare)

**POTERE di RISOLUZIONE:** capacità di distinguere 2 punti vicini

INVERSAMENTE proporzionale alla **lunghezza d'onda della luce** utilizzata =  
LIMITE di risoluzione del microscopio!

MICROSCOPIO OTTICO (luce visibile) < MICROSCOPIO UV < MICROSCOPIO ELETTRONICO

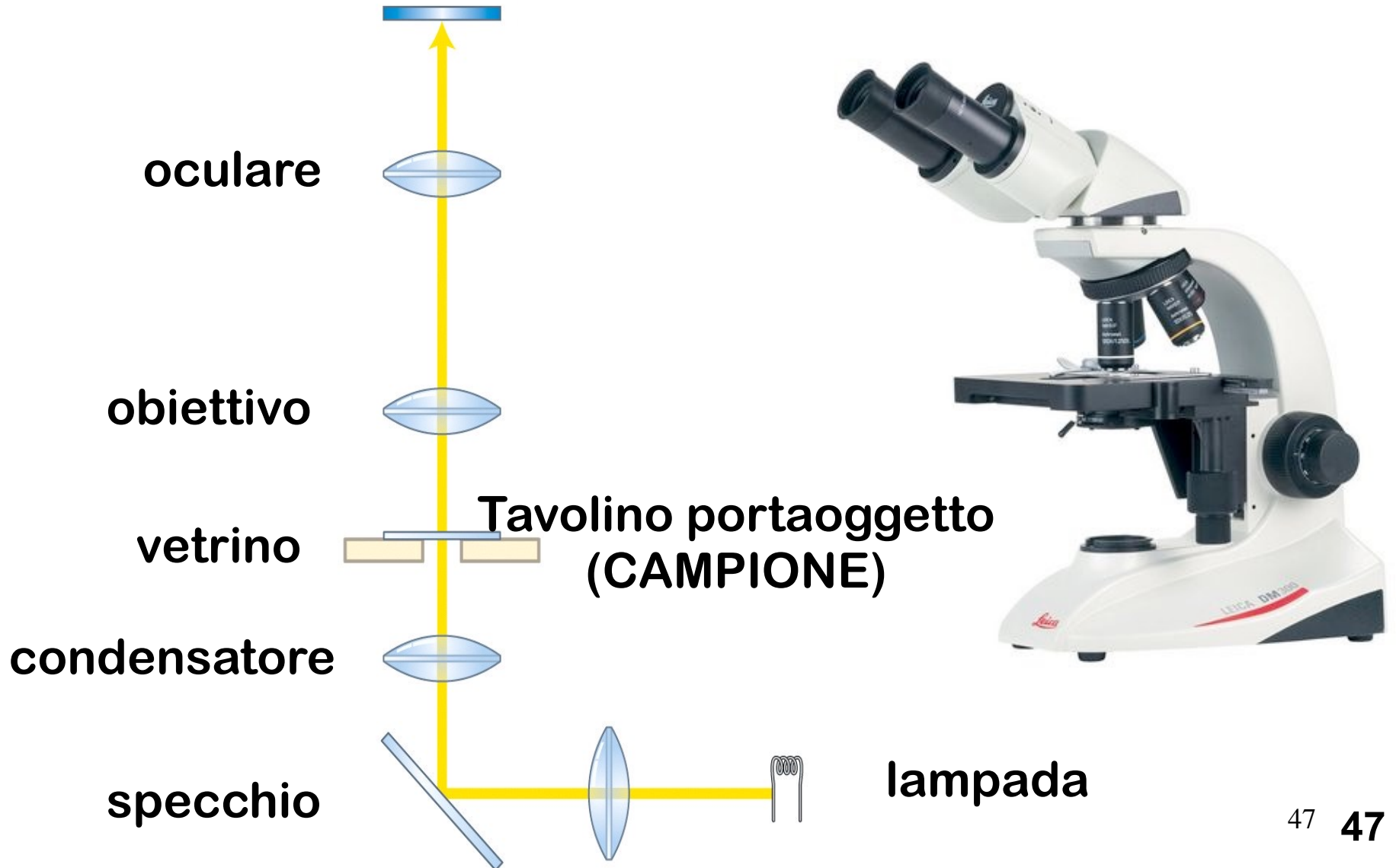


cellule di  
mammifero:  
**10-100 micron**

## MICROSCOPIO OTTICO

- Utilizza la **LUCE VISIBILE** per illuminare il campione.
- Il **potere di risoluzione massimo** ottenibile e' di **0,2 micron**
- il preparato e' posto su un **TAVOLINO** mobile ed e' illuminato da un fascio di luce incidente che, dopo aver attraversato il campione, passa attraverso **due sistemi di lenti** di ingrandimento, l'**OBIETTIVO** e l'**OCULARE**.
- Normalmente, l'**oculare** e' a ingrandimento fisso (**10x**), mentre l'**obiettivo** e' a ingrandimento variabile (**4-10-20-40x**)
- La **messa a fuoco** si ottiene spostando il sistema obiettivo/oculare rispetto all'oggetto

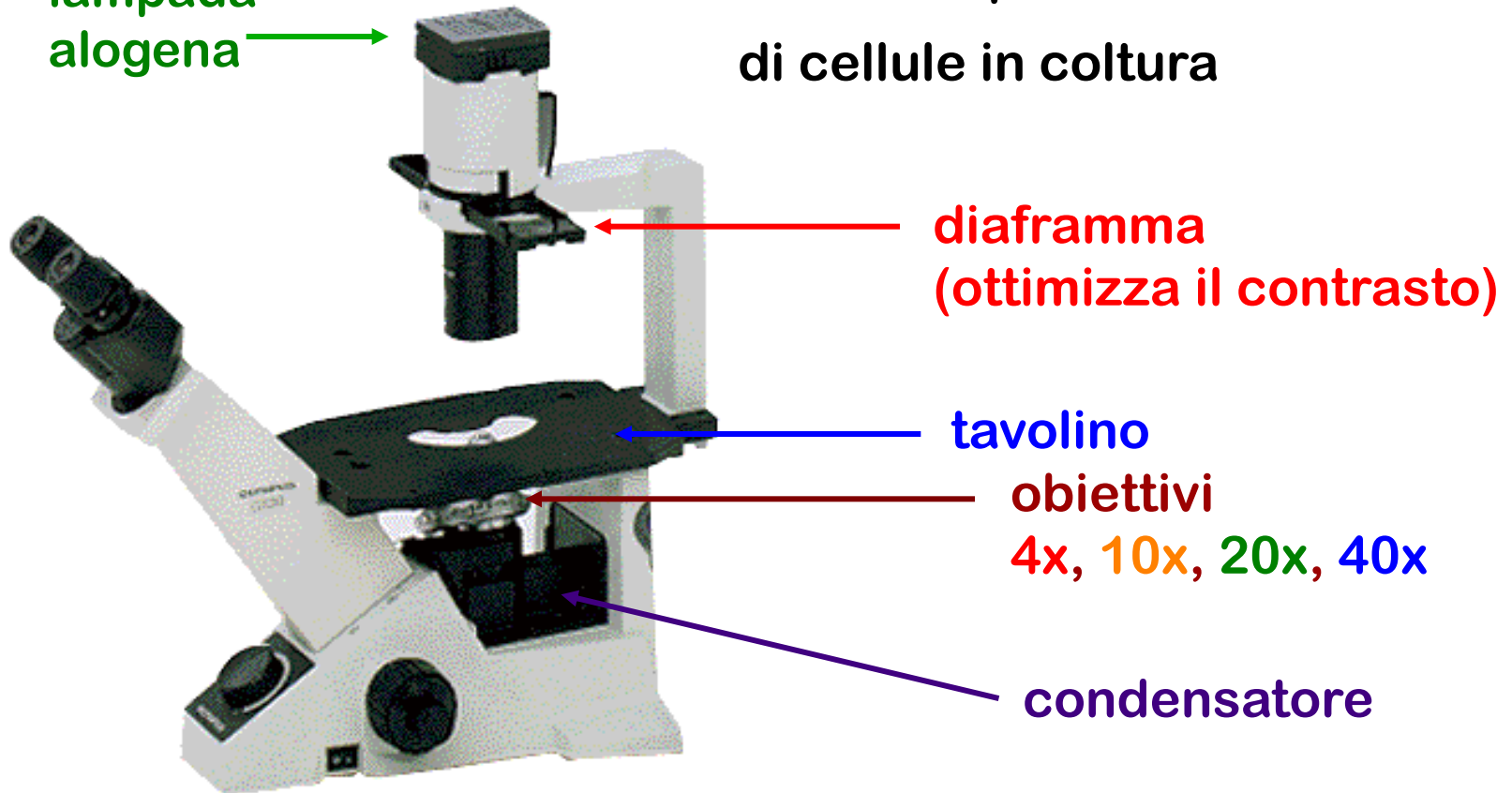
# MICROSCOPIO OTTICO DIRITTO (microscopio da istologia)



# MICROSCOPIO OTTICO ROVESCiato

lampada  
alogenata

Utilizzato per l'osservazione  
di cellule in coltura



in cui l'**illuminazione** proviene dall'**alto**

e gli **obiettivi** sono posti al di **sotto del tavolino** portaoggetto



## OSSERVAZIONE:

- **a fresco** (cellule vive, in terreno di coltura)

la capacità di osservazione è limitata dalle piccole differenze tra gli **indici di rifrazione** dei diversi componenti cellulari

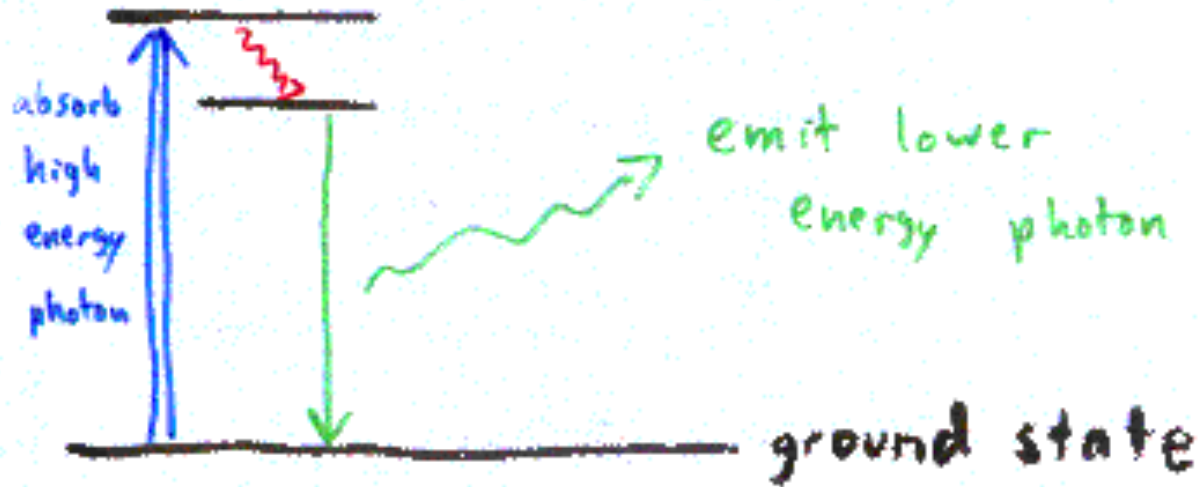
- **dopo fissazione e colorazione**

le cellule si disidratano con alcoli (metanolo-acetone)

o si usano aldeidi (formaldeide, glutaraldeide) per formare legami covalenti tra le proteine e gli acidi nucleici e disidratare il campione

Per aumentare il contrasto tra le diverse parti del preparato o i diversi organelli cellulari si può **colorare il campione (es. Ematossilina)**

## MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

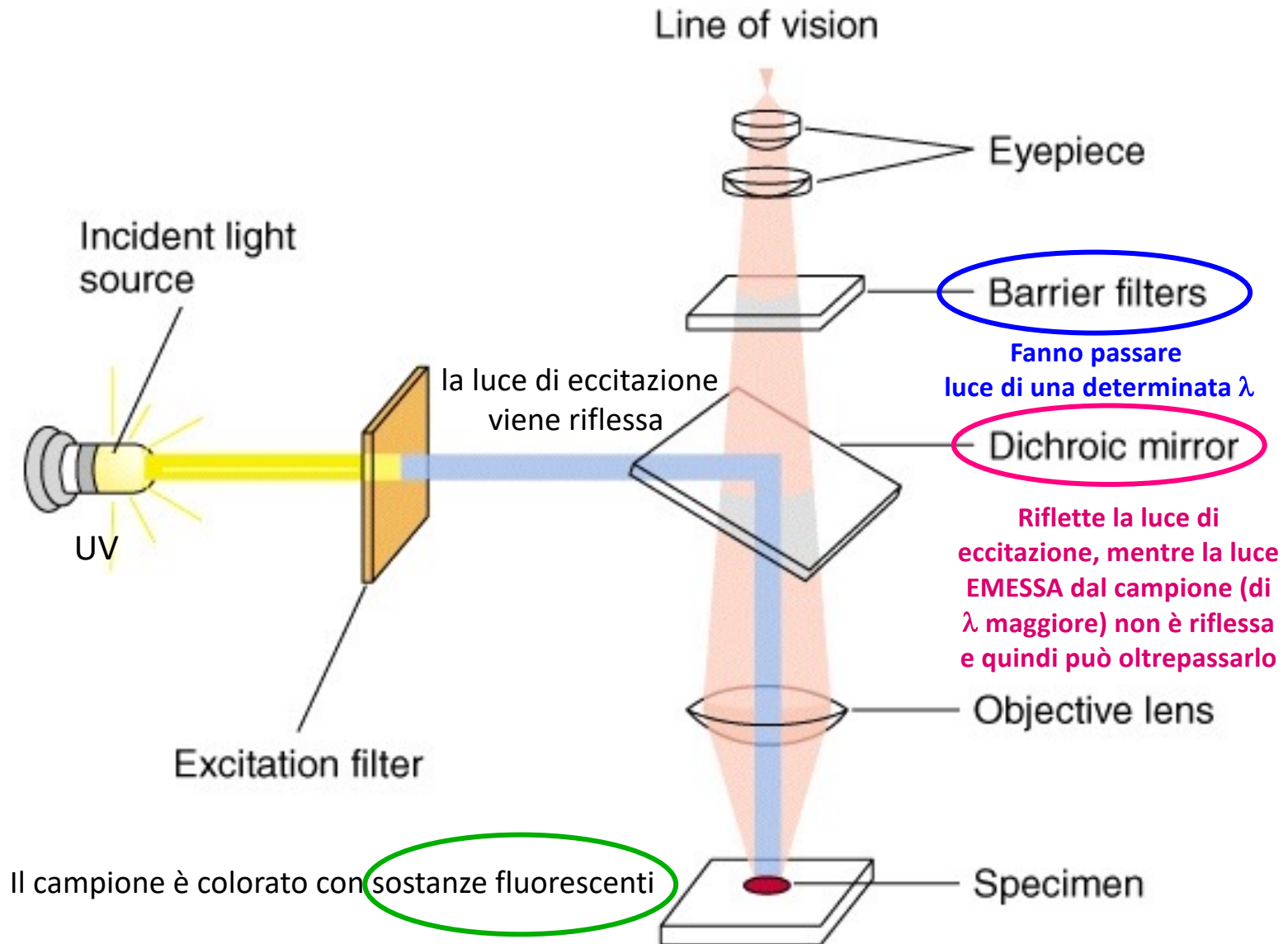


Per la visualizzazione della fluorescenza serve uno **strumento** in grado di eccitare il fluoroforo alla lunghezza d'onda  $\lambda$  eccitazione  
E di acquisire la luce emessa = luce di **fluorescenza**

## MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

- visualizza **LUCE DI FLUORESCENZA emessa** dal campione dopo eccitazione
- la **luce di eccitazione e' UV – visibile (può essere IR)**
- il **potere di risoluzione è di 10 nm**
- **l'ingrandimento massimo è 1000 x**  
(normalmente 10X per l'oculare e fino a 100X per l'obiettivo)
- la **luce di fluorescenza EMESSA** dal campione è usata per **formare l'immagine**

# MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA



Invitrogen™

# EVOS™ M5000 Imaging System

Microscopio campo chiaro/ fluorescenza rovesciato  
Fino a 4 canali



Live imaging

Obiettivi  
4x, 10x, 20x e 40x

# Microscopio a epifluorescenza upright Leica DM4000

