



1

TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE

Valentino Bezzetti • Giovanni Bellomo
Monica Borgatti • Emanuela Mari • Vincenzo Mattei

1.1 COLTURE CELLULARI

1.1.1 Introduzione alle colture cellulari

Le colture cellulari rappresentano una delle tecniche di base fondamentali e molto utilizzate nel campo della biologia cellulare sperimentale moderna e nel campo della biomedicina. Questa tecnologia consiste nel mantenere e far proliferare cellule eucariotiche o procariotiche in un sistema sperimentale controllato che cerca di mimare e ricostruire artificialmente il microambiente dal quale le cellule stesse sono state prelevate e isolate. Rappresenta quindi un sistema di coltura in vitro, che permette di studiare il comportamento delle cellule al di fuori dell'organismo d'origine, ma in condizioni definite, riproducibili, rigorosamente controllate e supervisionate dall'operatore. È una tecnica ormai considerata strumento imprescindibile per la ricerca di base e per applicazioni biotecnologiche in molteplici campi d'indagine, come gli studi di tossicità di diverse sostanze, lo sviluppo di terapie farmacologiche, la medicina rigenerativa, la produzione di vaccini e molto altro.¹⁻⁸

Lo sviluppo delle colture cellulari trae le proprie radici nei primi decenni del XX secolo, grazie a Ross Granville Harrison, che dimostrò per la prima volta la possibilità di far sopravvivere e crescere in vitro frammenti di tessuto nervoso embrionale, aprendo così la strada allo studio diretto delle cellule al di fuori dell'organismo. Successivamente Alexis Carrel sviluppò ulteriormente queste tecniche, contribuendo alla standardizzazione delle procedure sperimentali, delle tecniche asettiche e dei metodi di mantenimento a lungo termine.^{9, 10}

Un passaggio cruciale e determinante nella storia delle colture cellulari, che rivoluzionò la ricerca biomedica, si verificò nel 1951 con l'isolamento della linea cellulare HeLa, derivata da un carcinoma della cervice uterina e capace di proliferare indefinitamente in vitro, andando a costituire così la prima linea cellulare stabilizzata umana. Anche gli studi di Leonard Hayflick segnarono uno snodo decisivo, dimostrando che le cellule somatiche normali possiedono una capacità replicativa limitata, nota come limite di Hayflick, ed evidenziando quindi le differenze sostanziali tra cellule primarie e linee cellulari stabilizzate, con implicazioni fondamentali per la biologia dell'invecchiamento (senescenza cellulare) e della trasformazione neoplastica.¹¹⁻¹³

Le colture cellulari si fondano sulla ricostruzione artificiale di un microambiente idoneo alla sopravvivenza cellulare, sviluppato attraverso la fornitura di nutrienti, fattori di crescita, condizioni fisico-chimiche controllate e supporti adeguati per l'adesione o la crescita in sospensione. Le cellule possono essere ottenute direttamente da tessuti, dando origine alle colture primarie, oppure derivare da linee cellulari stabilizzate. Ciascun modello presenta vantaggi e limitazioni in termini di rappresentatività biologica, stabilità genetica e riproducibilità sperimentale. La scelta del modello cellulare è cruciale per la validità dei dati ottenuti, in particolare negli studi di citotossicità, farmacodinamica, farmacocinetica cellulare e valutazione di biomarcatori molecolari. Inoltre, linee cellulari di mammifero sono ampiamente utilizzate per la produzione di proteine ricombinanti e anticorpi monoclonali destinati all'impiego terapeutico, integrando le tecniche di coltura con strategie di ingegneria genetica e bioprocessi industriali. L'evoluzione tecnologica ha ulteriormente ampliato le potenzialità delle colture cellulari, passando dai tradizionali

sistemi bidimensionali a modelli tridimensionali più complessi, come organoidi e sistemi microfluidici, che mirano a riprodurre in modo più fedele l'architettura e le interazioni del microambiente tissutale.^{1, 8, 14, 15}

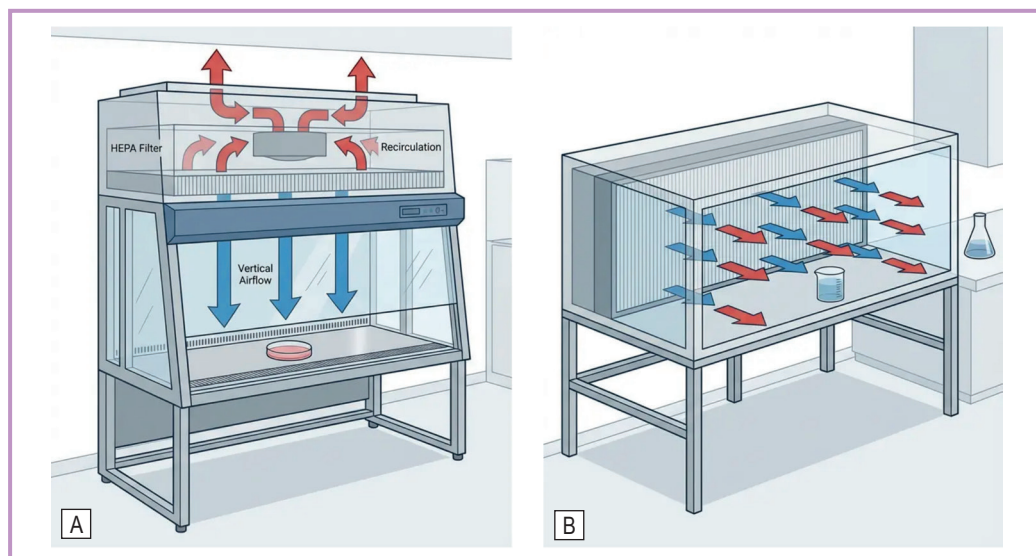
In questo capitolo verranno affrontati i principi teorici e soprattutto pratici delle colture cellulari, con l'obiettivo di fornire allo studente una base solida per comprendere non solo le procedure operative, ma anche i fondamenti biologici e metodologici che ne giustificano l'impiego ormai così su larga scala, sottolineando la necessità di un loro utilizzo critico e metodologicamente rigoroso.

1.1.2 Colture cellulari e tissutali animali

Le colture cellulari sono oggi uno degli strumenti più utilizzati nella ricerca biologica e biomedica e il loro uso deve essere svolto in ambienti specificamente organizzati per minimizzare il rischio di contaminazioni microbiologiche e per poter assicurare le migliori condizioni di crescita in vitro delle cellule stesse. Le procedure di coltura cellulare vengono normalmente effettuate in una cappa a flusso laminare di classe II, dove l'aria viene continuamente filtrata tramite filtri HEPA per garantire la protezione sia delle cellule sia del personale di laboratorio (**FIGURA 1.1**).

Tutti i materiali introdotti nella cappa e il piano di lavoro della stessa devono essere sterili e disinfettati prima di iniziare, con etanolo al 70%, proprio per evitare l'introduzione di contaminanti. Anche l'operatore deve indossare dispositivi di protezione individuale, indossando quindi il camice, i guanti monouso e, se necessario, mascherina e occhiali protettivi.^{1, 2}

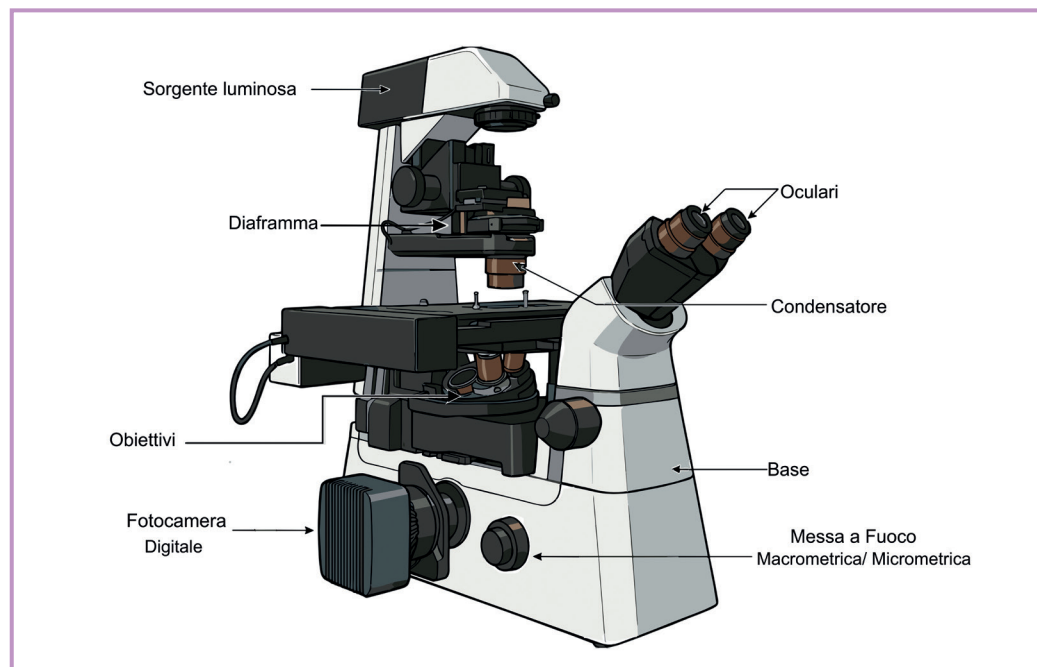
FIGURA 1.1. Principali configurazioni di cappe a flusso laminare utilizzate in laboratorio per la manipolazione sterile di campioni biologici e colture cellulari. A) Cappa a flusso laminare verticale, in cui l'aria filtrata attraverso filtro HEPA viene diretta dall'alto verso il piano di lavoro, contribuendo a proteggere il campione dalla contaminazione. B) Cappa a flusso laminare orizzontale, nella quale l'aria filtrata attraversa l'area di lavoro in direzione orizzontale. Le frecce indicano il percorso del flusso d'aria e il ricircolo all'interno del sistema per il mantenimento della sterilità durante le procedure sperimentali.



Come illustrato nella parte introduttiva di questo capitolo, le cellule coltivate in vitro necessitano di condizioni ambientali rigorosamente controllate che simulino l'ambiente fisiologico e naturale dal quale provengono e per questo motivo vengono mantenute in incubatori a 37 °C con un'atmosfera umidificata e al 5% di anidride carbonica. È doveroso ricordare e sottolineare che il controllo della concentrazione di CO₂ è fondamentale per mantenere il pH del mezzo di coltura entro valori fisiologici, normalmente compresi tra 7,2 e 7,4.¹

Le colture cellulari vengono solitamente osservate regolarmente mediante microscopio invertito (FIGURA 1.2), che permette di visualizzare e valutare la morfologia cellulare, la densità di crescita e la presenza di eventuali contaminazioni, aiutando l'operatore nel decidere come procedere sul piano sperimentale. Le colture cellulari possono essere suddivise in base a diversi parametri e criteri di differenziazione, ma sicuramente una prima divisione è quella tra colture primarie e linee cellulari. Le colture primarie derivano direttamente da tessuti animali e conservano molte delle caratteristiche fisiologiche del tessuto d'origine; tuttavia, presentano una capacità proliferativa limitata e sono più sensibili alle variazioni delle condizioni di coltura. Le linee cellulari, invece, sono cellule adattate alla crescita in vitro e possono proliferare per numerosi passaggi. Inoltre, alcune linee cellulari sono immortalizzate, cioè popolazioni di cellule in vitro che, avendo subito mutazioni

FIGURA 1.2. Principali componenti di un microscopio ottico invertito e percorso della luce durante l'osservazione del campione. La sorgente luminosa, collocata nella parte superiore dello strumento, emette un fascio di luce che viene concentrato dal condensatore e attraversa il campione posto sul tavolino porta-campione. La luce trasmessa attraverso il preparato viene quindi raccolta dall'obiettivo, situato al di sotto del campione, e convogliata attraverso il sistema ottico fino all'oculare o alla fotocamera, consentendo l'osservazione di dettagli non visibili a occhio nudo. Questa configurazione è particolarmente adatta all'osservazione di cellule in coltura, poiché consente di analizzare direttamente le cellule aderenti al fondo di flask, piastre o supporti multi-pozzetto, senza doverle trasferire il campione su un vetrino.



spontanee o indotte o alterazioni genetiche, superano la senescenza replicativa e si dividono indefinitamente. Nella pratica di laboratorio, l'uso di linee cellulari stabilizzate è molto diffuso perché consente una maggiore riproducibilità degli esperimenti (TABELLA 1.I).^{1, 8} Uno degli elementi fondamentali per poter far crescere le cellule in vitro è il mezzo di coltura, ossia un mezzo sotto forma liquida che rappresenta la fonte di nutrienti e fattori di crescita necessari per il metabolismo cellulare. I mezzi più utilizzati includono formulazioni come DMEM, RPMI-1640 o MEM, che contengono sali inorganici, aminoacidi essenziali e non essenziali, vitamine e una fonte energetica, generalmente glucosio.

A questi componenti viene inoltre spesso aggiunto il siero fetale bovino, che fornisce fattori di crescita, proteine e ormoni necessari per la proliferazione cellulare. La preparazione del terreno di coltura deve essere effettuata sempre in condizioni sterili. In pratica, il mezzo basale viene integrato con una percentuale di siero fetale bovino generalmente compresa tra il 5% e il 10%, al quale viene aggiunto un mix di antibiotici come penicillina e streptomicina, per ridurre il rischio di contaminazioni batteriche. Dopo la preparazione, il mezzo può essere filtrato attraverso filtri sterili con porosità di 0,22 µm per eliminare eventuali microrganismi. Il mezzo completo viene quindi conservato a 4 °C in contenitori sterili e portato a temperatura di incubazione prima dell'uso (TABELLA 1.II).¹

Una fase fondamentale e delicata nella gestione delle colture cellulari è la semina cellulare, detta anche *seeding*, ed è un'operazione che permette di distribuire una sospensione cellulare in contenitori di coltura sterili, come *flask* o piastre multi-pozzetto, alla densità desiderata (FIGURA 1.3).

Prima della semina è però necessario determinare la concentrazione cellulare mediante conteggio con emocitometro o sistemi automatizzati. Il conteggio manuale avviene generalmente utilizzando la camera di Neubauer e consiste nel mescolare una piccola aliquota della sospensione cellulare con una soluzione di Trypan Blue, un colorante vitale che penetra esclusivamente nelle cellule morte. Al microscopio le cellule vive appaiono rifrangenti mentre quelle morte risultano colorate di blu, consentendo così la valutazione della vitalità cellulare e la conta cellulare.

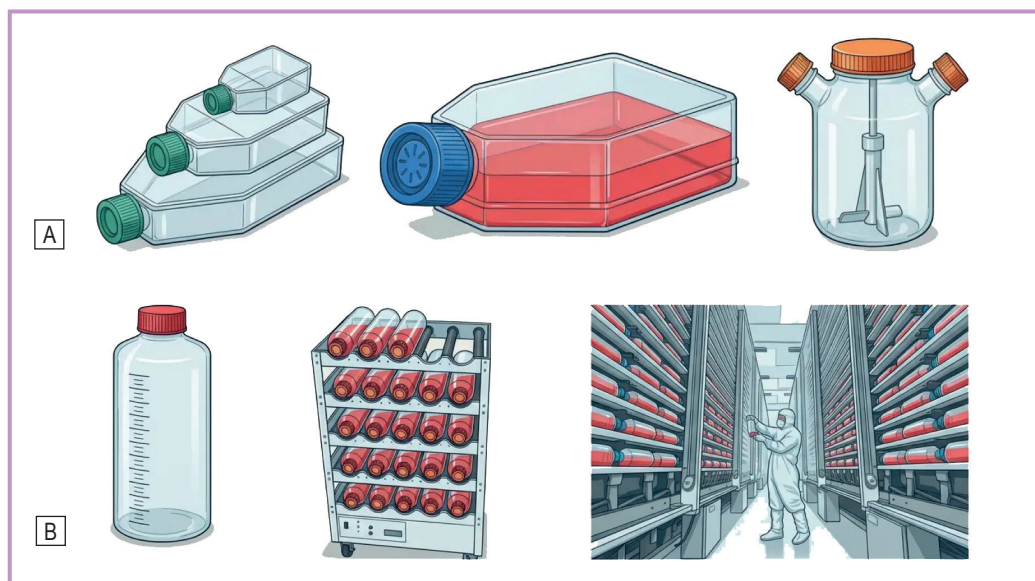
TABELLA 1.I. Principali apparecchiature utilizzate nei laboratori di coltura cellulare.

Strumentazione	Funzione principale	Note operative
Cappa a flusso laminare (classe II)	Ambiente sterile per manipolazione delle cellule	Disinfettare con etanolo 70% prima e dopo l'uso
Incubatore CO ₂	Mantenimento delle colture a temperatura e atmosfera controllata	37 °C, 5% CO ₂ , umidità elevata
Microscopio invertito	Osservazione morfologia cellulare	Permette monitoraggio crescita e contaminazioni
Centrifuga	Separazione cellulare e raccolta pellet	Usare velocità moderate (800-1200 rpm)
Bagno termostatico	Riscaldamento di mezzi e reagenti	Solitamente impostato a 37 °C
Criocontenitore/azoto liquido	Conservazione a lungo termine delle cellule	Temperatura circa -196 °C

TABELLA 1.II. Composizione tipica di un terreno di coltura.

Componente	Funzione biologica
Sali inorganici	Regolazione della pressione osmotica ed equilibrio ionico
Aminoacidi	Sintesi proteica
Glucosio	Fonte energetica per il metabolismo cellulare
Vitamine	Cofattori enzimatici
FBS	Fornisce fattori di crescita e proteine
Antibiotici (penicillina/streptomicina)	Prevenzione contaminazioni batteriche
Tampone bicarbonato	Controllo del pH in presenza di CO ₂

FBS: siero fetale bovino (*fetal bovine serum*).

FIGURA 1.3. Contenitori e dispositivi impiegati nelle colture cellulari in vitro: *flask* tradizionali per colture aderenti e *flask* con agitazione interna (A); flaconi e sistemi rotanti per colture su scala maggiore (B).

Dopo il conteggio, la sospensione cellulare viene diluita nel mezzo di coltura fino alla densità desiderata e distribuita nei contenitori di coltura. I contenitori vengono quindi trasferiti nell'incubatore e lasciati indisturbati per alcune ore per consentire l'adesione delle cellule al substrato, nel caso di cellule aderenti. La densità di semina è un parametro importante perché influenza la velocità di crescita, il comportamento cellulare e l'interpretazione del dato scientifico, e per questo va posta molta attenzione nella scelta. Nella maggior parte dei casi di colture cellulari, quando le cellule raggiungono un elevato grado di confluenza, generalmente tra il 70% e il 90% della superficie disponibile, è necessario effettuare la subcoltura o "passaggio" cellulare.

Questa procedura consente di mantenere le cellule in fase di crescita esponenziale e prevenire fenomeni di sovraffollamento che possono alterare il metabolismo cellulare; la fase del passaggio cellulare non va mai sottovalutata ed è soggetta alle scelte dettate dall'operatore, basate sul suo studio personale e sulla sua esperienza nel campo.² Nel caso di cellule aderenti, la subcoltura prevede innanzitutto la rimozione del mezzo di coltura e il lavaggio delle cellule ancora adese sulla parete della *flask* con PBS per eliminare residui di siero che potrebbero interferire con l'azione degli enzimi dissocianti nel passaggio successivo. In seguito, si aggiunge una soluzione di tripsina-EDTA che permette il distacco delle cellule dalla superficie del contenitore mediante digestione delle proteine di adesione e, dopo alcuni minuti di incubazione a 37 °C, solitamente dai 5 agli 8 minuti, si potrà osservare il distacco cellulare al microscopio e in alcuni casi anche ad occhio nudo semplicemente muovendo delicatamente la *flask* e osservandola contro luce. Una volta che le cellule risultano sospese nella soluzione di tripsina-EDTA, l'azione di questo enzima viene bloccata e neutralizzata aggiungendo mezzo contenente siero. La sospensione cellulare così ottenuta viene quindi raccolta in una provetta sterile e centrifugata per pochi minuti per concentrare le cellule. Il pellet cellulare ottenuto viene infine risospeso in mezzo fresco e utilizzato per seminare nuovi contenitori di coltura, in base al protocollo sperimentale scelto (TABELLA 1.III).^{1, 2}

Come già reso noto, uno dei problemi più frequenti nella coltura cellulare è rappresentato dalle contaminazioni microbiologiche: batteri, funghi e micoplasmi possono infatti alterare significativamente la crescita cellulare e compromettere la validità degli esperimenti. Le contaminazioni batteriche e fungine sono spesso riconoscibili per la torbidità del mezzo di coltura e per la presenza di particelle mobili osservabili al microscopio. La contaminazione da micoplasmi, invece, è più subdola e difficile da individuare e richiede test specifici di rilevazione.

TABELLA 1.III. Protocollo sintetico di subcoltivazione di cellule in adesione.

Fase	Procedura
1	Rimuovere il mezzo di coltura dalla flask
2	"Lavare" le cellule con PBS sterile
3	Aggiungere soluzione di tripsina-EDTA
4	Incubare 3-5 minuti a 37 °C
5	Verificare il distacco cellulare al microscopio
6	Aggiungere mezzo completo per bloccare la tripsina
7	Trasferire la sospensione cellulare in provetta
8	Centrifugare per 5 minuti a 1500 rpm
9	Risospendere le cellule in mezzo fresco
10	Seminare in nuovi contenitori di coltura

PBS: tampone fosfato salino (*phosphate buffered saline*); EDTA: acido etilendiamminotetraacetico.

TABELLA 1.IV. Principali contaminazioni nelle colture cellulari.

Tipo di contaminazione	Caratteristiche osservabili	Metodo di prevenzione
Batterica	Mezzo torbido, crescita rapida	Tecniche asettiche, antibiotici
Fungina	Filamenti o particelle nel mezzo	Sterilità ambientale
Micoplasmi	Alterazioni crescita cellulare, difficili da osservare	Test specifici e controllo periodico

La prevenzione delle contaminazioni si basa principalmente sull'applicazione rigorosa delle tecniche asettiche già descritte, sulla sterilizzazione dei materiali e sulla corretta manutenzione delle apparecchiature di laboratorio. È inoltre buona pratica controllare regolarmente le colture cellulari ed eliminare immediatamente le colture sospette (**TABELLA 1.IV**).¹

Un altro aspetto essenziale e cruciale nella gestione delle colture cellulari è la crioconservazione, che permette di conservare le cellule per lunghi periodi senza perdita significativa delle loro caratteristiche biologiche. Il congelamento cellulare viene effettuato utilizzando soluzioni crioprotettive contenenti generalmente dimetilsolfossido (DMSO) al 10% e siero fetale bovino o terreno di coltura. Il DMSO è fondamentale in questa fase perché agisce prevenendo la formazione di cristalli di ghiaccio che potrebbero danneggiare le membrane cellulari durante il congelamento. Nella pratica di laboratorio, le cellule vengono raccolte mediante tripsinizzazione (trattamento con tripsina) e successiva neutralizzazione di tale enzima, poi centrifugate e risospese nel mezzo di congelamento contenente DMSO, a una concentrazione appropriata. La sospensione cellulare ottenuta viene quindi distribuita in *criovial* sterili e sottoposta a congelamento graduale con una velocità di circa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ al minuto.

Questo si può ottenere mediante l'uso di contenitori di congelamento programmato o sistemi specifici per il raffreddamento controllato. Dopo il congelamento iniziale a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, i campioni vengono trasferiti in contenitori di azoto liquido per la conservazione a lungo termine a temperature intorno a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il processo contrario, cioè lo scongelamento delle cellule, dovrà poi essere effettuato rapidamente per minimizzare i danni cellulari. Nella pratica, quindi, le *criovial* vengono immerse in un bagno termostatico a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al completo scioglimento del ghiaccio e successivamente la sospensione cellulare viene trasferita in una provetta contenente mezzo di coltura a temperatura ambiente e centrifugata per rimuovere il DMSO, che può risultare tossico per le cellule se mantenuto per tempi prolungati. Dopo la centrifugazione, le cellule vengono risospese in mezzo fresco e seminate nei contenitori di coltura.^{1, 16-18}

Nel complesso, le tecniche di coltura cellulare rappresentano un insieme di procedure che richiedono precisione, attenzione e costante monitoraggio delle condizioni sperimentali. L'esperienza pratica dell'operatore svolge un ruolo determinante nel garantire la qualità e l'affidabilità dei risultati ottenuti mediante queste metodologie.

1.1.3 Le colture primarie

Le colture primarie sono costituite da cellule ottenute direttamente da tessuti animali o umani mediante procedure di isolamento e dissociazione che consentono la loro crescita in vitro. Esse rappresentano il primo stadio della coltivazione cellulare dopo il prelievo del tessuto e precedono qualsiasi passaggio di subcoltura.