

La **medicina di laboratorio** viene descritta come una scienza clinica applicata che utilizza metodi chimici, fisici e biologici per studiare le alterazioni dell'organismo in condizioni patologiche o di malattia. L'obiettivo principale è ottenere dati qualitativi o quantitativi numerici da campioni biologici prelevati dai pazienti, al fine di fornire informazioni utili per la diagnosi, il trattamento, la prevenzione, il pronostico e la riabilitazione.

La **medicina traslazionale**, invece, si concentra sulla trasformazione delle scoperte scientifiche ottenute dalla ricerca di laboratorio, dalla ricerca clinica e dagli studi di popolazione in nuovi strumenti clinici e applicazioni che migliorano la salute umana, riducendo l'incidenza, la morbidità e la mortalità delle malattie. Questo processo consiste nel tradurre le conoscenze scientifiche in nuove terapie, diagnostica avanzata e approcci preventivi.

Si devono considerare diversi livelli di un sistema biologico per comprendere le attività biologiche di una sostanza. Questi livelli includono il **livello genetico** (l'attivazione o repressione dei geni), il **livello cellulare** (l'effetto sul metabolismo, la biosintesi e la fisiologia delle cellule) e il **livello organismico** (come influisce sull'organismo nel suo complesso).

Vengono presentati anche due categorie di approcci sperimentali utilizzati nella ricerca biomedica: i **metodi in silico e i metodi biologici**. I metodi in silico si basano sull'uso dell'informatica e includono l'uso di tecniche omiche e lo studio di singoli geni. Questi metodi permettono di analizzare grandi quantità di dati e accelerare la sintesi di molecole farmacologiche. Tuttavia, non possono sostituire l'analisi su campioni biologici reali, quindi è necessario integrarli con gli approcci wetlab, che utilizzano sistemi biologici reali.

I metodi biologici comprendono gli **studi in vivo e in vitro**. Gli studi in vivo coinvolgono organismi interi o organi isolati che vengono mantenuti in vita mediante perfusione. Questi studi forniscono una visione complessiva dei fenomeni biologici nel contesto dell'organismo. Tuttavia, possono essere limitati nell'analisi dettagliata dei meccanismi molecolari. Gli studi in vitro, invece, utilizzano materiali biologici mantenuti in un ambiente artificiale che cerca di riprodurre le condizioni fisiologiche. Questi studi consentono di analizzare nel dettaglio i meccanismi biologici, ma possono presentare artefatti di laboratorio e non sempre possono essere direttamente extrapolati all'organismo nel suo insieme.

E' importante utilizzare **soluzioni fisiologiche** appropriate durante gli studi in vivo e in vitro. Queste soluzioni devono essere **simili** ai tessuti oggetto di studio, **isotoniche** alle cellule analizzate, **tamponate** per mantenere un pH fisiologico e **bilanciate** per quanto riguarda il contenuto di sali.

Il modello animale più comune utilizzato nella ricerca scientifica è rappresentato dagli **animali da laboratorio**, che includono anche l'uomo. I topi e i ratti sono gli animali più ampiamente utilizzati a causa della loro facilità di gestione, costo relativamente basso e rapida riproduzione. Nelle sperimentazioni, i risultati devono essere sempre confrontati con un **gruppo di controllo**, che riceve una sostanza inattiva chiamata placebo. Una delle tecniche utilizzate su questi animali è **l'autoradiografia a corpo intero**, che consente di monitorare la distribuzione, l'accumulo e l'eliminazione di sostanze estranee somministrate previa marcatura radioattiva. Il composto da testare viene marcato con un radioisotopo e iniettato nell'animale. Dopo un certo periodo di tempo, l'animale viene sacrificato sotto anestesia e congelato a basse temperature. Successivamente, l'animale viene fissato in una resina, sezionato e le sezioni ottenute vengono poste a contatto con una lastra autoradiografica a bassa temperatura per un certo periodo di tempo, fino a quando la lastra viene impressionata. Le aree più scure nella radiografia indicano le regioni in cui il radioisotopo (il farmaco) si accumula.

Viene descritto uno studio di **Ullberged e Waldsson** in cui sono state fatte sezioni di topi gravidi a cui è stato somministrato lo iodio. Lo scopo dello studio era osservare la captazione di iodio nelle topoline gravide. Si è scoperto che lo iodio viene inizialmente localizzato nello stomaco e poi riversato nell'intestino attraverso i succhi gastrici. Solo dopo 14 giorni la maggior parte dello iodio si localizza nella tiroide.

Vengono poi descritti **diversi tipi di modelli animali** utilizzati nella ricerca.

Il "**nude mouse**" o topo nudo è un topo caratterizzato da una compromissione del sistema immunitario, il che consente l'impianto di cellule provenienti da altre specie senza rigetto. Questo modello viene utilizzato anche per impiantare tumori prelevati direttamente dai pazienti (patient derived xenograft) per studiare l'eterogeneità dei tumori e valutare terapie personalizzate.

Il "**SCID mouse**" è simile al topo nudo, ma con una maggiore compromissione del sistema immunitario. Viene utilizzato nello studio dell'immunologia e delle malattie infettive per studiare la risposta immunitaria.

I **topi inbred**, ottenuti dall'incrocio tra i nati dalla stessa cucciolata per un numero significativo di generazioni, vengono utilizzati in genetica per analizzare le caratteristiche genetiche. Sono come avere molti gemelli omozigoti.

Topi transgenici knock-in e knock-out: Questi topi sono stati modificati mediante ingegneria genetica per sovraesprimere o silenziare l'espressione di un determinato gene al fine di comprendere la sua funzione. L'approccio utilizzato coinvolge l'inserimento del gene di interesse nel genoma di una cellula uovo, che viene quindi trapiantata in una madre adottiva per generare un **topo chimera**. Questo topo chimera ha sia cellule che esprimono i geni normali della madre sia cellule che esprimono il gene inserito. Successivamente, il topo chimera viene incrociato con topi normali per diverse generazioni al fine di ottenere topi eterozigoti e individuare eventuali topi omozigoti rispetto al gene inserito. I topi omozigoti rappresentano i topi knock-in (se il gene è stato inserito) o knock-out (se il gene è stato silenziato). Questa metodologia ha permesso di identificare la funzione di diversi geni, ad esempio il gene **HER2**, che è stato studiato per il suo ruolo nel carcinoma mammario. Nei topi transgenici che sovraesprimono HER2, si sono osservate lesioni ipermammarie e iperplastiche, nonché lo sviluppo di tumori metastatici. Questi topi sono stati utilizzati per studiare HER2, sintetizzare vaccini o testare farmaci che possano bloccare il tumore correlato a questo gene. Anche il **gene OB**, noto come gene dell'obesità, è stato identificato attraverso l'uso di topi knock-out. Il suo silenziamento ha portato all'obesità nei topi, evidenziando la sua funzione come ormone della sazietà chiamato leptina. La leptina è un ormone secreto dal tessuto adiposo che regola il senso di sazietà e agisce a livello ipotalamico per controllare l'appetito.

Limiti dei modelli animali nella ricerca scientifica. Questi includono i limiti economici, poiché l'uso degli animali può richiedere tempi e costi elevati, i limiti scientifici dovuti alla variabilità e alla difficoltà di estrapolazione dei risultati agli esseri umani, nonché le questioni etiche legate alla responsabilità morale verso gli animali.

Modello delle 3R proposto da **Russel e Burch (1959)**, che suggerisce di preferire tecniche che rimpiazzano o sostituiscano l'uso di animali nella ricerca, nonché raffinano le metodologie per ridurre le sofferenze degli animali utilizzati. Proprio per questo si prediligono i **modelli in vitro** come alternativa, che includono omogenati e colture cellulari (microbiche o animali) fornendo una riduzione dell'uso di animali, maggiore produttività, risposte rapide e una quantità limitata di sostanze chimiche necessarie.

L'omogenizzazione è un processo in cui il tessuto viene distrutto per rilasciare i composti intracellulari, che formano una sospensione e dunque l'identità morfologica e funzionale del tessuto viene distrutta. L'omogenizzazione è un processo empirico che richiede un'ottimizzazione specifica a seconda del tipo di analisi che si vuole effettuare. Successivamente, si passa alla fase di **separazione**, in cui i componenti dell'omogenato vengono raggruppati in base a caratteristiche fisiche simili, come la dimensione e/o la densità. Il **frazionamento cellulare**, invece, richiede la lisi cellulare e la separazione degli organuli mediante centrifugazione. Durante la lisi, la membrana plasmatica si rompe, causando la fuoriuscita degli organuli cellulari che vengono sospesi in un mezzo acquoso. Le particelle più grandi e dense sedimentano più velocemente.

Per ottenere una corretta omogenizzazione, sono importanti **tre fattori chiave**: la scelta del materiale di partenza (il tessuto), le proprietà fisiche e chimiche della soluzione fisiologica utilizzata e il metodo utilizzato per distruggere le cellule. Altri fattori da considerare includono la disponibilità del materiale, il costo e la facilità di purificazione. Inoltre, è consigliabile utilizzare le cellule il più rapidamente possibile per evitare processi di degradazione, mantenendole a basse temperature (4°C) fino alla omogeneizzazione.

Metodi di frazionamento cellulare possono essere utilizzati in base al tipo di materiale di partenza e allo studio che si intende affrontare. Si dividono in blandi e vigorosi.

I **metodi "blandi"** includono la lisi per osmosi, la digestione enzimatica e la solubilizzazione chimica. La lisi per osmosi viene utilizzata per globuli rossi e si basa sulla differenza di pressione osmotica tra l'ambiente intra- ed extracellulare, che causa il rigonfiamento cellulare e la rottura delle membrane. La digestione enzimatica viene impiegata per batteri e lieviti, in cui la parete cellulare può essere digerita con enzimi seguita dalla lisi osmotica della membrana cellulare. La solubilizzazione chimica, invece, utilizza solventi organici o detergenti per degradare le membrane/pareti, completando la degradazione con il rilascio di enzimi idrolitici endocellulari.

I **metodi "vigorosi"** sono quattro:

I metodi frizionali in mezzo solido includono la **macinazione con microsfe**re, che viene utilizzata per lieviti e sospensioni di cellule. Le cellule vengono mescolate con microsfe

re di vetro di piccolo diametro e sottoposte a un'agitazione vigorosa per diversi minuti. Le cellule vengono frantumate dagli urti meccanici tra le microsfe

re. I metodi frizionali in mezzo liquido comprendono **gli omogenizzatori tipo Potter**, utilizzati per tessuti animali come fegato, reni, cuore, ecc. In questo caso, le membrane cellulari vengono lacerate dalle forze frizionali generate da un pestello in teflon o vetro che ruota all'interno di un cilindro di vetro spesso. Lo spazio tra il pestello e le pareti del cilindro è molto ridotto. Gli **omogenizzatori a lame**, che sono normali frullatori, costituiscono un altro metodo frizionale in mezzo liquido. In questo caso, il tessuto viene sminuzzato grazie all'azione delle lame.

Il metodo di rottura con cella a pressione elevata, chiamato **French Press**, viene utilizzato per batteri e lieviti e per volumi medi di materiale. In questo metodo, la sospensione cellulare viene posta in una camera di compressione di acciaio inossidabile dotata di pistone e chiusa da una valvola a spillo. Si rimuove l'aria dalla camera, e mediante il pistone vengono applicate alle cellule pressioni idrauliche elevatissime. Successivamente, aprendo la valvola a spillo, le cellule fuoriescono dalla valvola e subiscono un brusco sbalzo di pressione che le fa gonfiare e rompere. L'omogenato viene raccolto mantenendo la stessa pressione e aprendo completamente la valvola. Infine, il metodo di rottura con ultrasuoni viene utilizzato per cellule in coltura o microbiche. In questo metodo, una sonda metallica di un sonicator viene immersa nella sospensione cellulare e vibra emettendo onde sonore ad alta frequenza. Le cellule vengono rotte dalle elevate pressioni locali generate da queste onde. Questo metodo è adatto per volumi piccoli. Si consiglia di lavorare in condizioni di ghiaccio o in camere fredde, poiché può generare molto calore e causare la denaturazione delle proteine.

I **vantaggi** nell'utilizzo di culture animali includono la capacità di analizzare i meccanismi cellulari e molecolari, la possibilità di ottenere varianti di cloni cellulari con funzioni specifiche, il controllo dell'ambiente di crescita, l'economicità e la velocità di risposta, la disponibilità di diversi tipi cellulari e l'assenza di problemi etici e legali. Tuttavia, ci sono anche degli **svantaggi**, come il fatto che le colture cellulari sono sistemi estremamente semplificati e possono mancare delle interazioni che si verificano nel corpo, rendendo difficile l'estrapolazione dei risultati, inoltre, la correlazione delle concentrazioni delle sostanze testate in vitro con quelle utilizzate in vivo può essere complessa. Altri svantaggi includono l'instabilità genomica delle linee cellulari stabilizzate in coltura e la difficoltà di mantenere condizioni di sterilità durante il processo di isolamento delle colture cellulari.

Colture primarie di cellule sono ottenute dalla dissociazione diretta di un organo o tessuto e conservano tutte le proprietà eziologiche e funzionali del tessuto di origine. Tuttavia, ci sono sfide associate all'isolamento delle colture primarie, in quanto possono sopravvivere solo un numero limitato di cellule e mantenere condizioni di sterilità adeguate.

La **procedura di isolamento** delle colture primarie richiede diverse fasi. Inizialmente, viene eseguito un espianto del tessuto in sala operatoria, lontano dal laboratorio di coltura cellulare. Questi passaggi possono causare contaminazione nella coltura. Il tessuto bioptico viene quindi sottoposto a **dissociazione meccanica**, frammentandolo in pezzetti sempre più piccoli. Successivamente, viene aggiunto un enzima proteolitico chiamato **tripsina** per degradare le interazioni proteiche tra le cellule e il substrato. La tripsina viene poi inattivata aggiungendo un mezzo di coltura contenente **siero bovino fetale**. Le cellule vengono centrifugate, piastrate e poste in una lastra di coltura all'interno di un incubatore a CO₂, che crea un ambiente artificiale per la sopravvivenza delle cellule.

La prima coltura ottenuta è una **coltura mista**, poiché nessun tessuto è composto da un unico tipo di cellula. Man mano che la coltura primaria viene mantenuta nell'incubatore per alcuni giorni, le cellule con capacità di proliferazione attiva aumentano di numero, mentre alcune cellule sopravvivono ma non si moltiplicano. Alcune cellule possono morire durante il processo, fino a raggiungere un equilibrio in cui la composizione della coltura è molto diversa da quella del tessuto originale. Quando si raggiunge questo **equilibrio**, è possibile procedere all'isolamento del tipo cellulare di interesse.

Esistono diverse metodiche per isolare i diversi tipi cellulari. Queste includono la separazione basata su parametri dimensionali, come il peso e la velocità di segmentazione, nonché l'adesione delle cellule a superfici diverse, come vetro o plastica. Altri metodi utilizzano anticorpi monoclonali marcati per riconoscere specifici antigeni di membrana attraverso la **citofluorimetria a flusso**. Un metodo semplice consiste nell'utilizzare un mezzo di coltura selettivo che favorisce la crescita di determinati tipi cellulari. A seconda della tecnica di coltura utilizzata, le cellule possono crescere in sospensione, come le cellule ematopoietiche, o aderire alla piastra di coltura, come le cellule epiteliali, mesenchimali o nervose.

Infine, viene menzionata una situazione in cui le cellule non possono aderire alla superficie della piastra, rimanendo tondeggianti. In questo caso, viene depositato uno strato di "**soft agar**" che impedisce alle cellule di formare interazioni proteina-proteina. Le cellule mantengono una forma sferica, con solo un'8% di possibilità di entrare nella fase di duplicazione. Tuttavia, questa percentuale aumenta quando le cellule riescono ad aderire a tutta la superficie disponibile.

Le colture primarie possono essere coltivate solo per un numero limitato di replicazioni cellulari, formando **colture secondarie**, le cui cellule andranno incontro a senescenza e morte. Tuttavia, le cellule delle colture secondarie possono acquisire la capacità di replicarsi indefinitamente, diventando immortali, a causa di eventi mutazionali o manipolazioni in laboratorio. La **telomerasi** svolge un ruolo importante in questo processo.

Quando le cellule sono coltivate in condizioni adeguate, iniziano a duplicarsi, ma la crescita si arresta quando le cellule raggiungono **la confluenza**, ovvero occupano tutto lo spazio disponibile. Ciò avviene perché i fattori nutritivi diventano limitati e le cellule normali entrano in quiescenza per inibizione da contatto, mentre le cellule tumorali continuano a crescere sovrapposte. E inoltre le cellule tumorali sono in grado di crescere senza ancoraggio al substrato.

Per evitare la morte delle cellule, è necessario fornire loro un **nuovo mezzo di coltura** e trapiantarle in una nuova piastra con densità inferiore, consentendo loro di continuare a crescere. Questo processo viene chiamato **subcoltura** e può essere ripetuto più volte. Le colture cellulari possono essere distinte in primarie a breve termine, che possono essere duplicate solo per poche volte, e primarie a lungo termine, che possono subire un numero maggiore di duplicazioni.

Durante il distacco delle cellule dalla piastra di coltura, vengono utilizzate soluzioni come **EDTA e tripsina** per interrompere le interazioni tra cellule e facilitare il distacco. Tra una subcoltura e l'altra, le colture cellulari seguono **quattro fasi di crescita**: fase di latenza (fase Lag), fase di crescita esponenziale (fase Log), fase stazionaria (o di quiescenza) e fase di morte. Se non vengono forniti nuovi nutrienti o spazio, la coltura cellulare decadrebbe e morirebbe.

Le colture primarie mostrano **tre diverse fasi di crescita nel tempo**: una fase iniziale di bassa proliferazione, una fase di crescita continua che richiede espansioni e una fase finale di decadimento o sviluppo di una linea cellulare secondaria. Se una linea cellulare primaria subisce una trasformazione che le conferisce la capacità di crescere indefinitamente, si ottiene **una linea cellulare continua o immortalizzata**, che però perde alcune caratteristiche del tessuto di origine.

Le **linee cellulari stabili** sono utili in laboratorio perché consentono di lavorare su una stessa linea cellulare per un lungo periodo. Tuttavia, possono perdere alcune caratteristiche delle cellule originali e possono presentare eterogeneità genomica. Le **linee cellulari clonali**, ottenute da una singola cellula mediante una tecnica di coltura specifica, sono utilizzate per ottenere una popolazione cellulare il più possibile omogenea. Queste linee cellulari clonali vengono utilizzate per lo studio degli effetti di espressione o silenziamento di specifici geni in vitro.

I test di laboratorio consentono di valutare l'effetto di diverse sostanze sulle cellule, inclusa la loro proliferazione, vitalità e capacità migratoria. Questi test sono utili per comprendere gli effetti di nuove sostanze o farmaci sulle cellule in vitro.

Per valutare la **citotossicità** di una sostanza, vengono eseguiti vari test che considerano diversi aspetti. I test di proliferazione e citotossicità sembrano fornire informazioni simili, ma in realtà osservano elementi leggermente differenti. Alcuni dei test utilizzati includono il Trypan Blue Stain, il Test MTT, l'incorporazione di 3H-Timidina e il Soft Agar Assay.

Il **test di Trypan Blue Stain Cell Count Assay** prevede diverse fasi. Le cellule vengono coltivate in piastre multi-well e trattate con la sostanza da testare. A intervalli di tempo specifici, le cellule vengono tripsinizzate e la sospensione cellulare viene diluita con Trypan Blue, un colorante che non può attraversare la membrana cellulare delle cellule vitali. Successivamente, le cellule vengono contate utilizzando una **camera di Burker** al microscopio, distinguendo tra cellule vitali e non vitali.

Per valutare la vitalità cellulare, il Trypan Blue Stain non è sufficiente, quindi viene eseguito **un test del MTT**. In questo test, le cellule vengono messe a contatto con MTT, che viene ridotto dalle cellule vitali tramite un enzima mitocondriale attivo. La riduzione del MTT provoca un cambiamento di colore dalla soluzione gialla a quella violacea, indicando il numero di cellule vitali presenti.

Un altro test utilizzato per valutare la proliferazione cellulare è **l'incorporazione di 3H-Timidina**, che misura la replicazione del DNA. Più timidina triziata viene incorporata, maggiore è la replicazione del DNA e il numero di cellule presenti.

Per valutare la capacità migratoria delle cellule, vengono utilizzati saggi come lo **scratch assay** e la **camera di Boyden**. Nel caso dello scratch assay, viene creato un "varco" in una coltura cellulare confluenza e le cellule migrano per richiuderlo. Questo saggio fornisce una visualizzazione visiva dell'attività migratoria, ma non offre dati statistici precisi. La camera di Boyden, invece, presenta due camere separate da una membrana microporosa, attraverso la quale le cellule possono migrare attivamente. Le cellule vengono seminate nella camera superiore e un agente attrattivo viene aggiunto nella camera inferiore. Dopo un periodo di incubazione, le cellule migranti vengono colorate e contate al microscopio.

La **capacità invasiva delle cellule tumorali** è diversa dalla capacità migratoria delle cellule, poichè richiede non solo la capacità di muoversi, ma anche la capacità di degradare la matrice extracellulare per raggiungere le cellule endoteliali e penetrare l'endotelio. Per valutare questa capacità invasiva, viene utilizzata una tecnica chiamata **"Boyden Chambers"**. In questa tecnica, una membrana porosa viene rivestita con una sostanza chiamata **matrigel**, che imita la matrice extracellulare. La procedura è simile a quella utilizzata per valutare la capacità migratoria delle cellule.

Le tecniche di separazione utilizzate nelle analisi dei campioni biologici. In molte analisi dei liquidi corporei, non è necessario isolare le sostanze da determinare, ma è possibile utilizzare i **metodi di determinazione diretta**. Questi metodi offrono vantaggi come rapidità, precisione e facilità di utilizzo su strumenti automatici. Tuttavia, ci sono alcuni limiti associati a questi metodi. Ad esempio, possono verificarsi interferenze delle proteine nel procedimento analitico, il che può portare a risultati inaccurati. Inoltre, se il materiale biologico in analisi non è limpido e incolore (ad esempio, sieri emolizzati, itterici, opalescenti), ci può essere una fonte potenziale di **inaccuracies**. Queste interferenze possono essere causate da sostanze come emoglobina libera, lipidi, bilirubina, globuline e farmaci. Gli effetti di queste variabili nei test di patologia clinica dipendono spesso dal metodo utilizzato. Oltre all'emolisi un'altra importante interferenza può essere lo **shock termico**. Questo può essere causato da conservazione inadeguata come il congelamento del sangue intero o un trasporto non idoneo a lunga distanza. Le variazioni di temperatura, sia caldo (superiore a 40°C) sia freddo (congelamento), possono causare la rottura dei globuli rossi per shock termico. L'emolisi in vivo, che si verifica all'interno dell'organismo, è meno frequente rispetto all'emolisi in vitro ed è spesso causata da condizioni come anemia emolitica o reazioni immunitarie.

Le tecniche basate su differenze di dimensioni e densità sono utilizzate per la separazione di composti, in particolare macromolecole, da altre molecole più piccole. Queste tecniche comprendono la dialisi, l'ultrafiltrazione e la centrifugazione.

La dialisi è una tecnica semplice che permette la separazione di macromolecole da sali e metaboliti più piccoli. Utilizza membrane semipermeabili con porosità controllata che consentono il passaggio di soluti con dimensioni inferiori a un certo valore critico insieme al solvente.

La dialisi avviene immergendo una soluzione contenente macromolecole proteiche in un sacchetto di dialisi e ponendolo in un grande volume di acqua pura. I sali e i soluti più piccoli diffondono attraverso la membrana verso l'acqua fino a raggiungere l'**equilibrio**, mentre le macromolecole rimangono all'interno del sacchetto. Questo processo può essere accelerato dalla rimozione continua dell'acqua esterna e dall'agitazione.

Il **valore di cut off** è il punto al di sopra o al di sotto del quale un test qualitativo viene considerato positivo o negativo. Nella dialisi, la separazione avviene in base alle dimensioni delle molecole, con le macromolecole che rimangono intrappolate nel sacchetto di dialisi.

La **dialisi mediante fibre cave** è una variante della dialisi in cui vengono utilizzate fibre cave con caratteristiche dializzanti. Queste fibre hanno un lume interno molto piccolo e consentono una rapida dialisi e desalificazione delle soluzioni. Le macromolecole rimangono all'interno delle fibre, mentre il solvente viene aspirato attraverso di esse, consentendo una concentrazione della soluzione macromolecolare. Le fibre cave possono essere prodotte con porosità variabile per consentire la separazione di macromolecole di diverse dimensioni.

L'**emodialisi o dialisi extracorporea** è un metodo di depurazione del sangue utilizzato per sostituire parzialmente la funzione renale nei pazienti con insufficienza renale cronica. Questo trattamento mira all'eliminazione dei prodotti tossici dal circolo sanguigno che non possono essere eliminati attraverso l'urina. Nella fase terminale dell'insufficienza renale cronica, l'emodialisi è un'opzione terapeutica insieme al trapianto renale per i pazienti affetti dalla malattia.

L'ultrafiltrazione è una tecnica di esecuzione semplice che consente di concentrare soluzioni proteiche e macromolecolari o, al contrario, ottenere soluzioni prive di macromolecole chiamate **ultrafiltrati**. Inoltre, consente la separazione di macromolecole con diversi pesi molecolari utilizzando membrane artificiali di diversa porosità, disponibili in commercio, che consentono il passaggio di molecole al di sotto di un determinato peso molecolare critico chiamato "**molecular weight cut off**" (MWCO), che può variare da 1.000 a 50.000. In laboratorio, l'ultrafiltrazione viene utilizzata anche per porre agli ultrafiltrati successive analisi, come la cromatografia per l'analisi qualitativa o quantitativa di molecole di piccole dimensioni. Si basa sull'**uso di filtri con pori calibrati** che permettono alle molecole di grandi dimensioni di essere trattenute, mentre il solvente e le molecole più piccole passano attraverso la membrana. La forza applicata per favorire la separazione può essere generata tramite vuoto, pressione o forza gravitazionale in una centrifuga.

L'**ultrafiltrazione mediante vuoto** utilizza una membrana di dialisi circolare posta su un disco di vetro poroso saldato a un supporto a forma di imbuto. Questo insieme costituisce un **ultrafiltro**, collegato a una beuta da vuoto, in cui viene inserita la soluzione da concentrare. Creando il vuoto, si avvia l'ultrafiltrazione e si concentra la soluzione. La pressione massima applicabile è di 1 atm. Per volumi discreti, vengono utilizzate **celle per l'ultrafiltrazione** in cui è possibile applicare una **pressione elevata**. Queste celle sono costituite da un recipiente robusto con un agitatore interno e una membrana filtrante sulla base. La soluzione da concentrare viene introdotta dall'alto, mentre un diverticolo permette l'accesso di gas (solitamente azoto) che esercita una pressione regolabile sulla soluzione. Sotto l'effetto della pressione, il solvente viene espulso dalla parte inferiore della cella attraverso la membrana, portando con sé i soluti con peso molecolare inferiore al valore critico determinato dalle dimensioni dei pori. Le molecole con peso molecolare superiore rimangono intrappolate all'interno della cella, dove la loro concentrazione aumenta gradualmente. L'agitatore magnetico mantiene la dispersione omogenea delle molecole per evitare che si accumulino sulla membrana e ne ostacolano il flusso. Le membrane ultrafiltranti possono essere riutilizzate per più operazioni, ma devono essere trattate con cura per evitare danni e conservate umide in un

frigorifero, preferibilmente con un agente batteriostatico.

Per volumi più piccoli, da decine di millilitri a microlitri, si utilizza la **centrifugazione con appositi ultrafiltri** collocati nelle provette da centrifuga. Questi ultrafiltri sono provette cilindriche di plastica con una membrana filtrante nel fondo piatto. Durante la centrifugazione, l'ultrafiltrato viene raccolto nella parte superiore delle provette vuote più lunghe.

La centrifugazione è una tecnica utilizzata per la separazione meccanica delle particelle solide presenti in una sospensione. Si basa sull'applicazione di un campo centrifugo che permette alle particelle di sedimentare a diverse velocità a causa delle loro diverse densità, dimensioni o forme. Questo metodo sfrutta il fatto che le particelle solide in una sospensione tendono a sedimentare a causa della forza di gravità.

Nel **principio della centrifugazione**, le particelle solide si separano spontaneamente dalla fase disperdente a causa del loro peso. Le particelle più pesanti sedimentano prima, seguite da quelle più leggere. Tuttavia, in alcuni casi, il tempo necessario per la sedimentazione naturale sarebbe troppo lungo, quindi la centrifugazione fornisce **un campo gravitazionale artificiale** più forte per accelerare il processo.

Durante la centrifugazione, le particelle di interesse vengono risospese in un solvente adatto e poste in provette o bottiglie all'interno di un contenitore chiamato **rotore**, che è posizionato centralmente sull'**albero motore della centrifuga**. Il campo gravitazionale artificiale viene generato dalla rotazione del rotore attorno a un asse centrale, aumentando così la velocità di sedimentazione delle particelle. La velocità di centrifugazione dipende dalla combinazione del rotore utilizzato e del numero di giri.

Le variabili che influenzano il processo di sedimentazione includono la concentrazione della sospensione, le caratteristiche della centrifuga utilizzata, la natura del mezzo e la forma delle particelle. La velocità di sedimentazione di una particella può essere espressa mediante il **coefficiente di sedimentazione**, che rappresenta la velocità di sedimentazione per unità di campo centrifugo applicato. Questo coefficiente dipende dalla temperatura, viscosità e densità della soluzione.

Le centrifughe sono composte da una camera, un rotore e un motore elettrico. Esistono diversi tipi di rotori, come i **rotori ad angolo fisso** (circa 50° rispetto all'asse di rotazione, a più velocità ed energia, per macromolecole e particelle fini, la sedimentazione avviene in parte sulla provetta) e i **rotori swing out** (portaprovette fissati al rotore con uno snodo, sono da preferire per centrifugare cellule e particelle e per la centrifugazione su gradiente, le provette durante la rotazione si dispongono perpendicolarmente all'asse, la sedimentazione avviene solo sul fondo del tubo).

Le centrifughe possono essere:

- **da banco**: più semplici, operano a T ambiente, 4000-6000 rpm (3-7kg), vi sono le **microcentrifughe** per la centrifugazione di piccoli volumi (0.2- 2 ml), capaci di raggiungere velocità fino a 14.000 rpm. Trovano largo impiego per le separazioni cellulari;
- **refrigerate** : T basse costanti per evitare alterazioni materiali organici, possono essere a **grande velocità** (25000 rpm, capacità: 1.5L) o a **grande capacità** (6000 rpm, capacità: 4-6L);
- **ultracentrifughe**: Velocità max : 80.000 rpm. La camera del rotore è **refrigerata, sigillata e sotto vuoto**, così da ridurre al minimo il surriscaldamento generato dall'attrito tra l'aria e il rotore in movimento. E' presente un **sistema di regolazione della temperatura sofisticato ad infrarossi** che registra in continuo la T e controlla il sistema di refrigerazione. E' presente un **sistema di sicurezza ("sistema frenante")** che impedisce al rotore di lavorare ad una velocità superiore alla

massima consentita. L'albero motore è **flessibile** per minimizzare le vibrazioni che si possono generare per leggeri sbilanciamenti del rotore.

La centrifugazione può essere utilizzata per scopi **preparativi**, come la separazione, l'isolamento e la purificazione di varie componenti, tra cui cellule, organuli, membrane, proteine, acidi nucleici, lipoproteine e virus. Esistono due approcci principali nella centrifugazione preparativa:

differenziale e in **gradiente di densità**. Centrifugazione differenziale: Separa i vari componenti di una sospensione in base alla loro diversa velocità di sedimentazione che dipende da dimensioni e densità delle particelle.

La **centrifugazione analitica** viene utilizzata per l'analisi di macromolecole o particelle già pure, al fine di studiare le loro caratteristiche di sedimentazione. Questo metodo fornisce informazioni sulla purezza del materiale, il peso molecolare e l'analisi conformazionale delle macromolecole.

L'elettroforesi è una tecnica separativa utilizzata nel contesto biologico per separare macromolecole cariche, come acidi nucleici, che presentano una carica negativa dovuta al gruppo fosforico, e proteine, che possono avere carica positiva, carica negativa o essere neutre a seconda delle catene laterali degli amminoacidi e del pH del mezzo.

La tecnica dell'elettroforesi si basa **sulla migrazione delle particelle cariche** attraverso l'applicazione di un tampone di corsa e di un campo elettrico. La forza elettrica agisce sulla carica delle molecole (q) attraverso il campo elettrico (E), consentendo il movimento delle particelle nel fluido biologico.

Le **applicazioni** dell'elettroforesi riguardano principalmente la separazione e l'analisi delle macromolecole. Per le proteine, l'elettroforesi può essere utilizzata per determinare il peso molecolare di una proteina all'interno di un miscuglio. Questo viene fatto confrontando la separazione delle proteine nel miscuglio con l'esecuzione parallela di proteine di peso noto chiamate **marker**. La purezza delle proteine può essere valutata analizzando la presenza di bande separate corrispondenti a proteine specifiche.

Nel caso degli acidi nucleici, l'elettroforesi è utilizzata per visualizzare le dimensioni dei frammenti genici. Questo è particolarmente utile nel clonaggio genico, dove un frammento genico viene inserito in un vettore e amplificato nelle cellule ospiti per produrre numerose copie. Per confermare la corretta amplificazione di un gene specifico, come ad esempio il gene dell'insulina, è necessario eseguire un'analisi di sequenza per verificare se la sequenza di nucleotidi corrisponde alla sequenza corretta.

Nell'ambito della quantificazione delle macromolecole, l'elettroforesi consente una **quantificazione relativa** piuttosto che assoluta. Ciò significa che la concentrazione di una proteina o di un acido nucleico viene confrontata con una sostanza di riferimento di concentrazione nota per determinare se le bande corrispondenti hanno spessori simili. Questa quantificazione relativa può essere eseguita utilizzando densitometri e software appositi.

Supporti elettroforetici: Questi includono carta, lastre di cellulosa, silice o allumina (che possono causare interferenze nell'analisi delle proteine), acetato di cellulosa, gel di agarosio e gel di poliacrilammide.

L'elettroforesi può essere eseguita sia in forma orizzontale che verticale. L'**elettroforesi verticale** è più comune nelle proteine ed il supporto (il gel) deve essere sempre in contatto con il tampone di corsa. Nell'**elettroforesi orizzontale**, si utilizzano ponti costituiti da carta da filtro o garza, che

all'interno di due soluzioni forma un polo negativo ed un polo positivo. Il foglio di carta favorisce il passaggio delle cariche elettriche e, a seconda della polarità della molecola da separare.

Elettroforesi su acetato di cellulosa: Si applica un tampone di corsa con un pH specifico (8,7), si costruisce l'apparecchiatura con due vaschette e un ponte, si effettua la corsa elettroforetica applicando un voltaggio di 200 V per 30 min. Dopo la corsa, si prende la membrana (foglio di carta) e la si immerge in una soluzione **di dicloroacetico** al 10% per fissare le proteine. Successivamente, si utilizza un colorante (**rosso ponceau**) per evidenziare le proteine sulla membrana. Le bande elettroforetiche ottenute corrispondono alle diverse proteine nel siero. Le concentrazioni delle proteine vengono calcolate utilizzando un software che analizza l'ampiezza del picco. Vengono forniti esempi di diversi profili elettroforetici in diverse condizioni, come processi infiammatori acuti [+alfa2 e +alfa1], infiammazione cronica [solo + alfa2], sindrome nefrosica [aumento gamma e -alfa2], gammopatia monoclonale [+ gamma e possibile mieloma], ipogammaglobulinemia [NO gamma] e cirrosi epatica [tutto scompensato].

L'elettroforesi su gel può essere eseguita utilizzando due tipi di gel: **agarosio o poliacrilammide**. Il gel di agarosio viene utilizzato per separare molecole di acidi nucleici con un numero di coppie di basi superiore a 100, mentre il gel di poliacrilammide è più adatto per la separazione di proteine e frammenti di DNA di dimensioni inferiori a 100 paia di basi.

Il **potere di risoluzione del gel** dipende dalla formazione di una rete di maglie più o meno fitte, determinata dalla quantità di agarosio o poliacrilammide utilizzata. Le dimensioni delle maglie influenzano la capacità delle macromolecole di passare attraverso il gel e separarsi. Una maglia più stretta ostacolerà il passaggio delle proteine o degli acidi nucleici di grandi dimensioni.

Il **gel di poliacrilammide**, chiamato anche **PAGE** (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), presenta diverse caratteristiche, tra cui una buona risoluzione per proteine di piccola e media grandezza, scarsa interazione delle proteine con la matrice e buona stabilità. La dimensione dei pori nel gel di poliacrilammide dipende dalla percentuale di bis acrilammide utilizzata.

La formazione del gel di poliacrilammide richiede l'aggiunta di un innesco, come **l'ammonio persolfato**, e un catalizzatore, come il **TEMED**, per velocizzare la polimerizzazione. Il tempo di polimerizzazione dipende da fattori come la temperatura e la concentrazione di poliacrilammide. Una concentrazione più elevata di poliacrilammide può consentire la separazione di proteine a basso peso molecolare, ma può ostacolare la migrazione delle proteine di grande dimensione.

Le proteine presentano cariche e possono migrare verso il polo positivo o negativo in base alla loro carica e dimensione. Per ottenere un'elettroforesi più ordinata, viene utilizzato il **sodio dodecilsolfato (SDS)**, che avvolge le proteine conferendo loro una carica negativa. Questo facilita la separazione delle proteine in base alle dimensioni durante l'elettroforesi. La tecnica che si chiama sds page facilita il compito dell'identificare immediatamente la proteina e rendere la visione dell'esperimento più ordinata (della separazione).

Alcune proteine possono formare **ponti di solfuro**, come l'insulina. Prima di caricare il campione sul gel, è necessario conferire una carica negativa al campione e utilizzare il **beta-mercaptoetanololo** per rompere i ponti di solfuro e linearizzare le proteine. Durante l'elettroforesi, le proteine si separano in base alle dimensioni, e quelle con un peso maggiore richiedono più tempo per raggiungere la fine della corsa rispetto a quelle con dimensioni inferiori.

Poi sono utilizzati di **un loading** e **un marker di controllo di caricamento** per controllare le dimensioni delle proteine e verificare la corretta separazione durante l'elettroforesi.

Il **gel di poliacrilammide** ha una consistenza simile a un gel per capelli ed è più resistente se contiene una maggiore quantità di poliacrilammide. Al contrario, se contiene una minore quantità di poliacrilammide, il gel sarà meno resistente e più flaccido.

La preparazione del gel avviene utilizzando due lastre di vetro come supporto, poiché il vetro è un materiale inerte e facilmente pulibile. I vetrini di vetro vengono posizionati uno sopra l'altro (*up e down*) e fissati con degli spaziatori, che possono avere uno spessore di 1 centimetro o 0 centimetri. Entrambi gli spessori producono lo stesso risultato finale del gel.

Successivamente, si prepara una soluzione di poliacrilammide mescolando la poliacrilammide con acqua come solvente di base. La soluzione deve avere una concentrazione del 10%, riducendo così la concentrazione originale (37%) della poliacrilammide. Viene anche aggiunto un tampone per mantenere il pH intorno a 7-8.

Nella soluzione vengono aggiunti un catalizzatore e un iniziatore per avviare la polimerizzazione della poliacrilammide. La soluzione viene quindi inserita nella vaschetta tra i due vetrini senza posizionare il **pettinino**, un oggetto che formerà dei pozzetti nel gel in cui saranno inseriti i campioni proteici. Dopo la polimerizzazione, viene preparata una seconda soluzione di poliacrilammide a concentrazione inferiore. Questa soluzione viene utilizzata per preparare i pozzetti in cui verranno caricati i campioni proteici. I campioni possono essere un singolo set di proteine o un miscuglio derivato da un estratto cellulare.

Una volta versata la prima soluzione nei vetrini, si forma il gel di poliacrilammide, che viene chiamato **revolving gel o separating gel**. Questa parte del gel è responsabile della separazione effettiva delle proteine.

Successivamente, viene posizionato il pettine nei pozzetti per creare dei vuoti in cui i campioni proteici verranno inseriti. Viene aggiunto anche il **beta-mercaptoetanol** come agente di caricamento, che colora i campioni proteici e facilita la loro visualizzazione durante l'elettroforesi. Il gel viene quindi applicato sui vetrini e i campioni proteici vengono caricati nei pozzetti. Successivamente, viene applicato un campo elettrico che spinge le proteine cariche negativamente verso il polo positivo. Le proteine iniziano a muoversi attraverso il gel in base alle loro dimensioni, posizionandosi sulla griglia di partenza.

Le proteine raggiungono la linea di fondo di immigrazione e da questo punto iniziano a separarsi. Le proteine più pesanti si muovono più lentamente rispetto a quelle più leggere. Durante la separazione, le proteine rimangono nell'ambiente circostante, adattandosi alle condizioni del gel prima di passare alla parte successiva del gel, appositamente costruita per permettere la separazione desiderata.

La concentrazione di poliacrilammide nel gel può essere regolata per separare proteine di diverso peso molecolare. Le concentrazioni possono essere regolate utilizzando **pompe di iniezione**, consentendo la modifica del gradiente all'interno del gel e la separazione di proteine a diverso peso molecolare. Si sottolinea che per ottenere tale flessibilità è necessario ottenere il gel da fornitori specializzati.

Per valutare l'efficacia della separazione e osservare il posizionamento delle proteine all'interno del gel, è necessario aggiungere al campione un **colorante**. Inoltre, è importante utilizzare un **marker di caricamento standard**, che consiste in una miscela di proteine con una specifica concentrazione e peso molecolare. Solitamente, i coloranti utilizzati rendono più visibili le bande centrali, che sono

colorate in rosso, mentre le altre bande sono colorate in blu. Questa differenziazione cromatica permette di valutare l'andamento della corsa delle proteine nel gel.

Il marker di caricamento standard è trattato dalla ditta produttrice in modo che sia sempre visibile. Vengono utilizzati coloranti speciali che evidenziano il marker durante l'elettroforesi. Tuttavia, se non si dispone di un sistema di rilevamento adeguato, la banda sarà visibile solo dopo un successivo passaggio di colorazione, poiché altrimenti si vedrebbe tutto bianco. Esistono vari metodi per migliorare la visualizzazione del marker, ma i due più comunemente utilizzati sono il "blu di coomassie" e la colorazione con argento ("silver stain").

Il "**blu di coomassie**" è un colorante che viene sciolto in acqua e metanolo e ha un potere di rilevamento di 0,1 microgrammi di proteine. Ciò significa che se la quantità di proteina caricata all'interno del gel è inferiore a 0,1 microgrammi, il colorante non riuscirà a colorarla e quindi non sarà visibile. D'altro canto, la **colorazione con argento** ("**silver stain**") ha un potere di rilevamento 100 volte superiore ed utilizza ioni di argento, risultando molto più sensibile. Nel caso della colorazione con argento, la reazione produce un colore più scuro, tendente al nero, ma permette di visualizzare le bande in modo più nitido e di rilevare concentrazioni molto più basse.

Per la colorazione con il "blu di coomassie", si prepara una soluzione colorata che viene lasciata agire sul gel per circa un'ora a temperatura ambiente con agitazione. Successivamente, si utilizza una soluzione decolorante per rimuovere il colorante in eccesso, che deve agire per un periodo di tempo più lungo, quasi tutta la notte. Alla fine del processo, il marker precedentemente citato diventa visibile insieme alle altre proteine colorate. Il colore presente nel gel rappresenta tutte le proteine che erano presenti nella miscela e si sono separate in base al loro peso molecolare. Le bande più intense indicano una maggiore quantità delle rispettive proteine nell'estratto.

L'elettroforesi in agarosio è una tecnica simile all'elettroforesi su gel di poliacrilammide, utilizzata per separare gli acidi nucleici, come il DNA, in base al loro peso molecolare. L'agarosio è uno zucchero derivato dalle alghe, che si scioglie facilmente in acqua o in una soluzione tampone. A differenza della poliacrilammide, non richiede un iniziatore chimico per formare il gel, ma si solidifica naturalmente quando raffreddato.

Il processo di preparazione del gel di agarosio coinvolge diverse fasi. Inizialmente, si pesa una quantità specifica di agarosio e si scioglie in acqua o soluzione tampone. Questa soluzione viene riscaldata a una temperatura superiore a 45°C per favorire la completa dissoluzione dell'agarosio. Successivamente, si versa la soluzione di agarosio liquida in uno box di plastica, nel quale è stato precedentemente posizionato un pettine per creare i pozzetti in cui verranno caricati i campioni. Durante il raffreddamento del gel, l'agarosio polimerizza e forma una rete tridimensionale di maglie attraverso le quali gli acidi nucleici possono migrare. La densità di queste maglie dipende dalla concentrazione di agarosio utilizzata: maggiore è la concentrazione, più strette saranno le maglie.

Per facilitare la visualizzazione e il progresso della corsa degli acidi nucleici nel gel di agarosio, vengono aggiunti due coloranti: il **blu di bromofenolo** e lo **xilene cianolo**. Questi coloranti, miscelati con glicerolo, fungono da marker di caricamento e si separano nel gel in base al loro peso molecolare. Durante l'elettroforesi, gli acidi nucleici carichi negativamente si sposteranno verso il polo positivo del campo elettrico, mentre i coloranti blu si muoveranno a ritmi diversi, creando due bande distinte. La banda più scura corrisponde al blu di bromofenolo, che generalmente indica la migrazione di acidi nucleici più lunghi, mentre la banda più chiara rappresenta lo xilene cianolo, associato ad acidi nucleici più corti.

Per la rivelazione dei frammenti di DNA nel gel di agarosio, viene utilizzato un agente di rilevamento chiamato **bromuro di etidio**. Questa sostanza, altamente tossica, si intercala tra le basi del DNA durante la corsa elettroforetica, marcando il DNA stesso. Per rendere visibili le bande di DNA, il gel viene esposto a raggi ultravioletti (UV), che inducono la fluorescenza del bromuro di etidio, permettendo la visualizzazione delle bande e l'identificazione dei frammenti di interesse.

Questa tecnica è utilizzata per vari scopi, ad esempio, nell'analisi di frammenti genici, nel clonaggio di geni, nell'identificazione di mutazioni genetiche e nella determinazione delle dimensioni dei frammenti di DNA.

L'elettroforesi capillare può essere usata per separare specie ioniche utilizzando le cariche ioniche e le forze di frizione. La separazione avviene in fase liquida a 24 gradi per 5min a 8000 V e le sieroproteine migrano in base alla carica elettrica e alla ripartizione cromatografica sulle pareti del capillare. Si usa un microcapillare in silice fusa riempito da una sostanza che funge da setaccio molecolare. La rilevazione avviene senza ausilio di coloranti, ma tramite misura **dell'assorbanza a 214 nm** da parte di un detector a raggi UV posto alla fine del capillare. Ogni molecola che passa attraverso il capillare viene schedata, registrata, passata attraverso un metal detector e il segnale, che essa genera nel passaggio, viene inviato ad un sistema di acquisizione dei dati, dove viene elaborato e poi convertito in segnale digitale che produce un'immagine al monitor.

L'IMMUNOCHEMICA: è una disciplina che si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali o policlonali a scopo diagnostico. Gli anticorpi monoclonali sono preferibili quando disponibili, in quanto rappresentano una categoria importante di sostanze biofarmaceutiche utilizzate nella ricerca e nella pratica clinica sia come agenti diagnostici che terapeutici. La loro elevata specificità consente loro di riconoscere in modo selettivo bersagli molecolari specifici.

Gli **anticorpi** sono proteine sieriche prodotte dalle plasmacellule (linfociti B differenziati) in risposta al riconoscimento di sostanze estranee chiamate antigeni. Essi sono in grado di riconoscere e legare sequenze o regioni strutturali specifiche degli antigeni, chiamate determinanti antigenici o epitopi. Questa interazione forma un complesso antigene-anticorpo (complesso immunitario). Di solito, un antigene immunizzante contiene diversi epitopi, quindi diversi linfociti B sintetizzano e secernono ciascuno un anticorpo unico che riconosce con elevata affinità un determinato epitopo. Le tecniche immunologiche sfruttano questa specificità per identificare e quantificare macromolecole, componenti cellulari o cellule intere.

Gli anticorpi appartengono al gruppo delle proteine sieriche chiamate immunoglobuline o gamma globuline. Esistono cinque classi distinte di immunoglobuline: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, ordinate in base alla loro concentrazione decrescente. Tutti gli anticorpi hanno una struttura di base simile, composta da due coppie di catene polipeptidiche disposte a forma di Y. Le catene, legate tra loro da ponti disolfuro, sono distinte in catene "pesanti" e "leggere" in base al loro peso molecolare. Ciascuna catena presenta due regioni funzionali: una regione variabile all'estremità ammino-terminale responsabile del legame dell'antigene, e una regione costante all'estremità carbossi-terminale conservata per tutte le immunoglobuline di una determinata classe.

La caratteristica fondamentale degli anticorpi è la loro capacità di riconoscere in modo altamente specifico un bersaglio molecolare. Gli anticorpi monoclonali hanno diverse applicazioni, principalmente nella diagnostica di laboratorio e nella diagnostica per immagini. Possono essere utilizzati per identificare e quantificare sostanze specifiche nel campione biologico, consentendo una diagnosi più accurata. Inoltre, possono essere impiegati come agenti terapeutici per colpire selettivamente cellule o molecole bersaglio, ad esempio nel trattamento di alcune forme di cancro.

La **diagnostica di laboratorio** utilizza gli anticorpi per la rilevazione qualitativa e quantitativa di specifici analiti in campioni biologici. I saggi immunologici sfruttano l'interazione specifica tra antigene e anticorpo per identificare e misurare sostanze specifiche. La rilevazione qualitativa consente di identificare macromolecole, componenti cellulari o cellule intere, mentre la rilevazione quantitativa determina la concentrazione di una particolare sostanza.

È possibile produrre anticorpi in laboratorio sfruttando il principio secondo cui qualsiasi molecola può stimolare una risposta immunitaria e la produzione di anticorpi in organismi predisposti. È quindi possibile generare una risposta immunitaria controllata in laboratorio che porta allo sviluppo di cloni linfocellulari specifici in grado di produrre anticorpi diretti contro la molecola prescelta. Gli anticorpi così prodotti possiedono caratteristiche di specificità e avidità nei confronti della molecola bersaglio.

Gli antisieri **policlonali**, ottenuti da animali immunizzati con l'antigene specifico, sono stati a lungo la fonte di anticorpi per l'analisi. Tuttavia, ogni clone di linfocita B produce un solo tipo di anticorpo specifico per un determinato determinante antigenico. Di conseguenza, gli antisieri policlonali contengono una miscela eterogenea di anticorpi derivanti da cloni di linfociti B diversi, ognuno specifico per un determinante antigenico diverso dello stesso antigene. Gli antisieri policlonali presentano limiti in termini di specificità, poiché possono verificarsi reazioni crociate con antigeni simili.

Gli anticorpi **monoclonali**, invece, sono biochimicamente omogenei e puri, diretti contro un singolo epitopo e caratterizzati tutti dalla stessa specificità. La produzione di anticorpi monoclonali è stata introdotta da Kohler e Milstein nel 1975. Il metodo si basa sulla fusione cellulare tra un linfocita B che produce anticorpi specifici e cellule di mieloma, formando cellule ibride capaci di produrre anticorpi monoclonali della specificità desiderata.

Il **processo di produzione degli anticorpi monoclonali** comprende diverse fasi. Inizialmente, si immunizzano topi con un antigene specifico e si isolano i linfociti splenici produttori di anticorpi.

Simultaneamente, si prepara una sospensione di cellule di mieloma mutagenizzate che non secernono immunoglobuline. Successivamente, le due sospensioni cellulari vengono fuse utilizzando agenti come il polietilenglicole (PEG). Si formano tre tipi di ibridi: normale-normale, mieloma-mieloma e normale-mieloma. Gli ibridi normale-mieloma vengono selezionati utilizzando un terreno selettivo che causa la morte delle cellule che non esprimono l'enzima ipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasi (HGPRT). Vengono quindi isolati gli ibridomi in grado di attaccare l'epitopo specifico dell'antigene. Nel processo di derivazione dei cloni, dopo la fusione cellulare, è necessario identificare i cloni che producono l'anticorpo desiderato. Una tecnica comune è il clonaggio per diluizione al limite, in cui una singola sospensione cellulare di ibridomi viene diluita e distribuita in pozzetti di piastre per coltura, in modo che ogni pozzetto contenga un solo ibridoma. I cloni vengono testati per la produzione di anticorpo attraverso l'esame del mezzo di coltura degli ibridomi. I cloni produttori di anticorpi monoclonali possono essere mantenuti in coltura indefinitamente e crioconservati per avere una fonte stabile di anticorpi.

Per la produzione su larga scala, è possibile espandere la coltura dell'ibridoma in vitro e raccogliere il surnatante contenente gli anticorpi. Altri metodi, come la coltura in fibre cave o l'inoculazione dell'ibridoma in topi immuno-soppressi per ottenere liquido ascitico ad alta concentrazione di anticorpi, consentono di ottenere quantità elevate di anticorpi.

Gli anticorpi monoclonali offrono vantaggi come specificità, derivazione da un clone isolato, produzione su larga scala e possibilità di preparazione da antigeni non purificati. Tuttavia, presentano svantaggi come una specificità eccessiva, affinità fissa, limitata attività biologica e costi elevati di produzione.

Le **applicazioni degli anticorpi monoclonali** includono il dosaggio di antigeni, ormoni, farmaci e altri composti tramite test immunologici competitivi (L'antigene, presente nei campioni, compete con un antigene marcato per il legame agli anticorpi presenti in quantità limitante) o non competitivi (La presenza dell'antigene viene testata mediante l'impiego di un anticorpo marcato). Possono essere utilizzati anche nella ricerca e identificazione di antigeni specifici, nella terapia mirata, nella diagnostica di laboratorio, nella ricerca biologica e nella terapia immunosoppressiva.

Il **dosaggio radioimmunologico (RIA)** si basa sulla competizione tra l'antigene presente nel campione biologico e un antigene radiomarcato (^{125}I) e presente in concentrazione costante e nota. Nel RIA competitivo, si utilizzano anticorpi specifici legati a una fase solida. Si costruisce una curva standard dose-risposta utilizzando diluizioni scalari di concentrazioni note dell'antigene. La quantità di radioattività misurata consente di determinare la concentrazione dell'antigene nel campione. Il RIA offre vantaggi come elevata sensibilità, elevata specificità e possibilità di automatizzazione, ma presenta svantaggi come il costo elevato delle apparecchiature e dei reagenti e i pericoli radiologici associati all'uso di traccianti radioattivi.

L'**immuno radiometric assay (IRMA)** è una variante del RIA che utilizza un anticorpo marcatore radioattivo contro l'antigene da determinare. L'IRMA è più sensibile del RIA e offre vantaggi come una relazione lineare tra la quantità di radioattività e l'antigene presente e una maggiore stabilità.

I **dosaggi immunoenzimatici (EIA)** combinano una reazione antigene-anticorpo con una reazione enzimatica. Un esempio di EIA è l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), che può essere eseguito utilizzando diverse metodologie come il metodo competitivo, il metodo del doppio anticorpo e il metodo indiretto. Gli enzimi utilizzati come marcatori includono la perossidasi di rafano (HRP), la fosfatasi alcalina, la glucosio ossidasi, l'acetilcolinesterasi e la galattosidasi. I substrati enzimatici includono cromogeni, fluorofori e molecole chemiluminescenti.

Il **metodo competitivo** utilizza un antigene marcato con un enzima e un antigene non marcato presente nel campione in esame. Questi vengono fatti reagire con un anticorpo specifico legato a una fase solida, creando una competizione sul sito di legame dell'anticorpo tra l'antigene marcato e quello non marcato.

Il **metodo del doppio anticorpo**, noto anche come metodo sandwich, coinvolge l'utilizzo di un anticorpo coniugato con un enzima indicatore. Una soluzione contenente un antigene a concentrazione sconosciuta reagisce con un anticorpo specifico legato a una fase solida. Successivamente viene effettuato un lavaggio e viene aggiunto un secondo anticorpo marcato con enzima.

Il **metodo indiretto** viene utilizzato per misurare la quantità di un anticorpo. Il campione da dosare, ad esempio un siero umano, reagisce con l'antigene specifico legato a una fase solida. I complessi antigene-anticorpo sierico vengono rilevati mediante l'aggiunta di un secondo anticorpo anti-immunoglobulina diretto contro la porzione costante dell'anticorpo sierico e marcato con un enzima.

Dopo l'elettroforesi, che consente la separazione delle proteine in base alla massa molecolare, vengono utilizzati metodi di rilevamento come la colorazione con Coomassie blue stain o Silver stain. Il silver stain è più sensibile e fornisce un'indicazione sulla separazione delle proteine.

L'immunoblotting o Western blotting è un metodo avanzato per la rilevazione delle proteine. Permette di determinare se una specifica proteina è presente o meno in un miscuglio di proteine separate. Questa tecnica coinvolge il trasferimento delle proteine su una membrana, noto come Western blot. Altre tecniche simili includono il Southern blot per il trasferimento del DNA e il Northern blot per il trasferimento dell'RNA. L'Immunoblotting o Western blotting è una tecnica che consente di rilevare proteine specifiche all'interno di un campione. Questo metodo prevede diverse fasi:

1. **Elettroforesi su gel:** Le proteine nel campione vengono separate in base alla loro massa molecolare mediante l'elettroforesi su gel. SDS-PAGE è comunemente utilizzato per conferire una carica negativa uniforme alle proteine, in modo che si separino in base alla massa molecolare anziché alla carica.
2. **Trasferimento su membrana:** Dopo la separazione delle proteine nel gel, queste vengono trasferite e fissate su una membrana, che può essere di nitrocellulosa o PVDF. Il trasferimento avviene applicando un campo elettrico, in modo che le proteine si spostino dalla gel al supporto della membrana.
3. **Saturazione o "blocking":** La membrana viene poi sottoposta a una fase di saturazione o "blocking" per prevenire il legame non specifico degli anticorpi successivi. Questo processo coinvolge l'incubazione della membrana in una soluzione contenente proteine come albumina di siero bovino o latte in polvere, che coprono i siti di legame non specifici.
4. **Legame dell'anticorpo primario:** Viene aggiunto l'anticorpo primario specifico per la proteina bersaglio. L'anticorpo primario viene incubato sulla membrana per un certo periodo di tempo, di solito a una temperatura controllata, in modo che possa legarsi in modo selettivo alla proteina bersaglio.
5. **Legame dell'anticorpo secondario:** Successivamente, viene aggiunto un anticorpo secondario coniugato con un enzima o un fluoroforo. L'anticorpo secondario riconosce l'anticorpo primario e si lega ad esso, amplificando il segnale di rilevamento.
6. **Rilevazione:** La presenza della proteina bersaglio viene rilevata attraverso l'attività enzimatica o la fluorescenza dell'anticorpo secondario legato. Questo può essere visualizzato utilizzando reagenti chimici specifici o apparecchiature specializzate come scanner per Western blot.

I materiali utilizzati sono: Spugnette -- 3 fogli di carta da filtro imbevuti di tampone di trasferimento – Gel -- Membrana -- 3 fogli di carta da filtro imbevuti di tampone di trasferimento – Spugnette

Le proteine devono passare dal gel alla membrana e poi dalla membrana al filtro. In realtà, la membrana è fatta in modo tale che, una volta attraversata dalle proteine, quest'ultime non riescono più ad uscire perché vengono intrappolate dalla membrana stessa. Per cui, anche se il flusso di corrente continuasse, le proteine rimarrebbero bloccate. Se si invertono gli elettrodi, le proteine non si trasferiscono più sulla membrana, ma sulla carta da filtro, quindi vengono perse. Alla fine, si ottiene un foglio di carta bianco e il gel trasparente (senza nessuna banda) perché le proteine sono andate perse.

L'Immunoblotting o Western Blotting è una tecnica utilizzata per identificare e studiare specifiche proteine. Nel processo, è preferibile eseguire l'Immunoblotting a temperature basse (4 gradi o con l'uso di ghiaccio) per evitare la degradazione delle proteine, che sono termolabili. La durata del blot bagnato è di circa 1-1,5 ore, mentre il blot secco può richiedere 30-40 minuti, poiché utilizza una tecnologia diversa. La tecnica di Immunoblotting include anche il rilevamento dell'efficienza del trasferimento delle proteine sulla membrana. La presenza di bolle d'aria può compromettere l'esperimento, poiché le bolle impediscono alla membrana di aderire completamente al gel, creando spazi mancanti nella banda di proteine trasferite.

Oltre al rilevamento, è possibile utilizzare una tecnica di colorazione per valutare la corretta esecuzione dell'esperimento e procedere allo step successivo. Una delle colorazioni utilizzate è il "red pounce" (rosso pounce), che è reversibile e si lega alle bande proteiche, ma può essere rimosso con lavaggi successivi. Un'altra colorazione comune è il "coomassie" che si lega in modo irreversibile alle proteine.

Prima di aggiungere l'anticorpo primario per rilevare la proteina di interesse (antigene), è necessario eseguire un passaggio di saturazione o blocking. Questo passaggio consiste nel bloccare i siti idrofobici liberi sulla membrana, che potrebbero interferire con l'esperimento. L'albumina di siero bovino o il latte scremato vengono spesso utilizzati per bloccare questi siti, e la durata del blocking è di massimo 1 ora a temperatura ambiente.

Successivamente, si utilizza l'anticorpo primario, che si lega specificamente alla proteina oggetto di studio (antigene). Gli anticorpi possono essere monoclonali, riconoscendo un'unica regione epitopica, o policlonali, riconoscendo diversi epitopi. L'anticorpo primario può essere utilizzato da solo o coniugato a un sistema di rilevamento come la perossidasi o un fluorocromo.

È possibile acquistare anticorpi già coniugati ai sistemi di rilevamento, oppure è necessario eseguire un ulteriore passaggio. Dopo il lavaggio per rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato, si aggiunge l'anticorpo secondario, che si lega all'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è meno costoso poiché riconosce la regione costante dell'anticorpo primario. È importante utilizzare un anticorpo secondario ottenuto dalla stessa specie dell'anticorpo primario, poiché la regione costante è specie-dipendente.

In generale, gli anticorpi agiscono come sonde sensibili che consentono di rilevare specifiche proteine nel Western Blotting, sia tramite anticorpi primari che si legano direttamente alla proteina di interesse, sia tramite anticorpi secondari che riconoscono e si legano all'anticorpo primario.

L'anticorpo secondario svolge un ruolo cruciale nel test di rilevamento. Esso può essere legato a un sistema di rilevamento come la perossidasi o i fluorocromi. La perossidasi è utilizzata nella reazione di chemiluminescenza, in cui una lastra fotografica viene esposta alla luce emessa durante la reazione e successivamente sviluppata in bianco e nero. Altrimenti, anticorpi coniugati a fluorocromi possono essere utilizzati per generare segnali luminosi che vengono acquisiti digitalmente tramite un computer. In passato, si utilizzavano anche isotopi radioattivi, ma a causa dei rischi associati, si preferisce evitare il loro impiego.

Durante il test, una membrana contenente l'anticorpo primario e l'anticorpo secondario legato al fluorocromo viene inserita in un sistema di alloggiamento. L'anticorpo secondario viene eccitato e acquisisce energia, raggiungendo un alto livello energetico. Tuttavia, per ragioni di stabilità, il fluorocromo rilascia una parte dell'energia accumulata, che viene misurata come lunghezza di emissione, differente da quella di eccitamento. La lunghezza di emissione viene misurata e analizzata tramite un software che mostra la banda corrispondente e consente di eseguire un'analisi in base a una banda di dimensioni note. Maggiore è l'emissione, maggiore è il pixel generato, indicando una maggiore quantità di proteina legata all'anticorpo primario. *Nel contesto della ricerca sul COVID-19, viene sfruttata la reazione antigene-anticorpo, dove le strisce di test contengono diverse proteine, che possono essere anticorpi stratificati sulla membrana o antigeni, a seconda del tipo di analisi.*

Nel procedimento, le gocce di sangue prelevate vengono messe in soluzione e fatte migrare. Ciò porta alla formazione di una banda che deriva dal legame tra l'antigene e l'anticorpo specifico. Durante lo sviluppo di una lastra fotografica, viene utilizzata la luce rossa in una camera oscura per evitare che la luce solare danneggi la lastra. La lastra viene posizionata sul filtro, seguita da un'incubazione della proteina di riferimento a un'altezza specifica. Successivamente, vengono aggiunte concentrazioni crescenti dello stesso estratto proteico per determinare la specificità e la sensibilità dell'anticorpo utilizzato. Questo aiuta a stabilire l'altezza a cui la banda dovrebbe essere visualizzata. Se l'anticorpo viene aggiunto e non c'è la proteina di riferimento nell'estratto, ci si aspetta un risultato senza bande, cioè bianco. È essenziale capire la quantità di estratto necessaria per rilevare eventuali differenze di espressione e valutare la selettività dell'anticorpo, poiché l'aumento della quantità di proteina comporta un corrispondente incremento nella visualizzazione della banda.

LA CITOFLUORIMETRIA: è una tecnica utilizzata per l'analisi qualitativa e quantitativa di particelle biologiche o cellule presenti in una sospensione. Può essere impiegata nell'analisi dell'emocromo-citometrica o per identificare la presenza di cellule tumorali in un liquido biologico, come il sangue, durante l'immunoterapia antitumorale.

Inizialmente, la citofluorimetria si concentrava sull'analisi delle cellule senza separarle. Tuttavia, con l'avanzamento della citofluorimetria a flusso, che utilizza anticorpi coniugati con fluorocromi, è stato possibile anche separare le cellule o specifici componenti cellulari mediante il sistema di sorting. Durante il sorting, la sospensione cellulare viene fatta passare attraverso un fluido, consentendo la separazione delle cellule desiderate. Successivamente, le cellule possono essere analizzate nella loro struttura, conteggiate per una valutazione sommaria del loro contenuto o raccolte in un ambiente sterile per essere coltivate e successivamente analizzate.

La citofluorimetria permette di misurare e caratterizzare parametri fisici e chimici delle particelle biologiche o delle cellule in sospensione. La tecnica fornisce un'analisi completa delle dimensioni, struttura e complessità delle componenti cellulari in pochi minuti. Questo consente di identificare diverse caratteristiche fisiche e chimiche che possono descrivere e illuminare una particolare cellula o componente cellulare. La tecnica può essere utilizzata per analizzare cellule, virus o batteri e offre un'ampia gamma di applicazioni.

Nel contesto della citofluorimetria, è possibile anche utilizzare sonde specifiche per riconoscere regioni particolari all'interno delle cellule. Ad esempio, si possono separare linfociti da macrofagi o eritrociti sfruttando le loro differenze di struttura a livello della membrana cellulare utilizzando anticorpi che riconoscono gli antigeni di membrana.

Le cellule stesse emettono una fluorescenza intrinseca, anche senza l'utilizzo di fluorocromi. Ad esempio, le cellule in coltura su un vetrino possono emettere una fluorescenza verde quando vengono esposte a specifiche radiazioni. Questa fluorescenza intrinseca delle cellule può essere sfruttata per l'analisi. La citofluorimetria offre vantaggi e limitazioni, compresi i costi associati, ma consente l'analisi di numerosi parametri. È importante mantenere le cellule in sospensione in una soluzione omogenea, evitando l'aggregazione delle componenti cellulari, ad esempio, nell'emocromo, in cui le cellule vengono mantenute in continuo movimento per evitare l'occlusione reciproca.

Nel sistema di illuminazione utilizzato nella citofluorimetria, le soluzioni all'interno della provetta vengono fatte passare attraverso un sistema fluidico. Per facilitare il passaggio delle cellule, si aspira la soluzione e si utilizza un fluido come il fosfato pbs, che fornisce la spinta necessaria. Il fosfato pbs deve anche garantire che le proteine rimangano separate lungo tutto il percorso. Le sospensioni di cellule vengono fatte passare attraverso un setaccio molecolare con filtri molto piccoli per evitare aggregati cellulari e separare le cellule senza danneggiarle. Questo permette alle cellule di passare una per volta.

Nel caso del sorting delle cellule, si utilizzano lampade laser, che sono più costose ma più durevoli rispetto alle lampade al neon. Il tipo di lampada utilizzato dipende dall'esperimento. Ad esempio, per l'emocromo si preferiscono le lampade al neon più economiche, mentre per l'analisi delle cellule tumorali si utilizzano i laser che forniscono maggiori informazioni.

Le cellule vengono spinte attraverso una camera di flusso utilizzando un tampone e dei forellini e vengono mescolate e separate lentamente. È possibile regolare la velocità con cui la luce passa in base alle necessità dell'esperimento e alle capacità dello strumento. Una volta separate, le cellule vengono monitorate e registrate. Si può ottenere una distinzione tra le cellule in base alla loro dimensione e complessità utilizzando il fenomeno di rifrazione, riflessione e diffrazione chiamato light scattering. La dimensione delle particelle viene analizzata tramite il forward scatter, che misura la deviazione del fascio di luce in base alla grandezza della cellula, mentre la complessità viene analizzata tramite il side scatter o right scatter, che dipende dalla deviazione della luce causata dalla complessità interna della cellula.

Durante l'emissione, un fotone viene eccitato da un laser, passa a un orbitale superiore e poi decade. Durante la decadenza, il fotone emette energia, ma con una lunghezza d'onda diversa da quella di eccitazione.

La citofluorimetria utilizza fluorocromi per etichettare le cellule e rilevare la fluorescenza emessa. Alcuni esempi sono il FITC (verde), l'APC (rosso) e l'Alexa 405 (arancione/giallo). I dati vengono elaborati attraverso un sistema ottico che registra la luce diffusa e la fluorescenza, un sistema elettronico che trasforma i segnali in impulsi elettrici e un software per l'analisi dei dati. I risultati possono essere rappresentati tramite istogrammi o grafici bidimensionali come dot-plot e contour-plot.

Nell'applicazione della citofluorimetria allo studio del sangue, le componenti sanguigne come eritrociti, piastrine e globuli bianchi vengono analizzate. Le caratteristiche delle cellule, come dimensione e granularità, vengono valutate tramite forward scatter e side scatter. L'identificazione delle cellule viene ulteriormente supportata dall'uso di markers superficiali specifici, come antigeni, che possono essere riconosciuti da anticorpi coniugati. Questa tecnica è utilizzata per lo studio dei linfociti B e T, consentendo di identificare marcatori presenti in diversi stadi di sviluppo cellulare e di rilevare la presenza di forme tumorali e il loro stato di amplificazione. La citofluorimetria, attraverso il FACS (fluorescence-activated cell sorting), permette di eseguire indagini con una specificità determinata dagli antigeni presenti nelle diverse fasi cellulari. Sempre attraverso quest'ultima è possibile misurare il quantitativo di DNA cellulare. Ciò è possibile attraverso l'analisi del ciclo cellulare, dove nelle diverse fasi si ha un cambiamento del quantitativo del DNA.

Un metodo semplice per l'analisi del ciclo cellulare utilizza l'ioduro di propidio, un marcatore del DNA. Questo composto si lega al DNA e emette una fluorescenza rossa che può essere registrata. Tuttavia, poiché non esiste una netta distinzione tra le diverse fasi del ciclo cellulare, è necessario combinare l'analisi con altri marker, come l'espressione di proteine come le cicline. Questa analisi supplementare può essere eseguita tramite diverse tecniche, tra cui la citofluorimetria (FACS), elettroforesi o western plot.

Per studiare le cellule vive, viene utilizzato l'HOECHST 33342. La citofluorimetria è anche utilizzata per valutare l'apoptosi cellulare, che si manifesta attraverso specifiche modificazioni che portano alla perdita dell'integrità della membrana e alla formazione di corpi apoptotici. L'esposizione della fosfatidilserina (PS) sulla superficie cellulare è un indicatore dell'apoptosi. Utilizzando anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi, è possibile rilevare la presenza di cellule in apoptosi.

La compensazione è un fenomeno tipico dei fluorocromi utilizzati nella citofluorimetria. Quando si utilizzano fluorocromi con lunghezze d'onda simili, possono verificarsi sovrapposizioni che richiedono una correzione per vedere il colore desiderato senza perdere l'intensità dei segnali. La compensazione consiste nel sottrarre una porzione del segnale di un fluorocromo da un canale specifico per ottenere una visualizzazione corretta del colore desiderato, senza perdita di intensità.

Il **gating** è un metodo utilizzato nella citofluorimetria per isolare specifiche popolazioni cellulari attraverso finestre elettroniche. Le popolazioni possono essere caratterizzate fenotipicamente utilizzando diversi colori contemporaneamente. Ci sono tre strategie di gating: separazione netta tra cellule positive e negative per i markers, sovrapposizione parziale della fluorescenza e spostamento leggero dell'istogramma delle cellule positive rispetto a quelle senza marker.

Il **sorting** è una forma di gating reale che implica la raccolta fisica delle popolazioni cellulari separate dal resto della miscela. Vengono definite finestre di selezione per identificare le popolazioni di interesse che vengono quindi separate e raccolte in provette distinte.

Durante il sorting, le cellule mantengono la loro vitalità. In Italia, a differenza di altre nazioni, non c'è ancora una legge che permette di utilizzare i modelli sperimentali come i cosiddetti **patient derived xenograft**: in pratica, nel campo dell'oncologia sperimentale, piccoli pezzi di tumore vengono iniettati in animali immunodeficienti, cioè animali privati dall'uomo delle caratteristiche del sistema immunitario.

La legge italiana che riguarda l'obiezione di coscienza degli studenti di medicina e farmacia e prevede che non ci debba essere discriminazione per coloro che sono obiettori di coscienza. Questa legge si applica a diverse professioni, come farmacisti, medici e ricercatori che lavorano con animali da laboratorio.

I farmaci devono essere sempre testati perché i risultati ottenuti in vitro potrebbero non corrispondere a quelli in vivo. I test dei farmaci avvengono spesso utilizzando piastre di Petri con una linea cellulare specifica che viene nutrita e mantenuta in condizioni controllate.

Durante la Seconda guerra mondiale, gli errori nella scelta dei modelli sperimentali portarono alla somministrazione della talidomide alle donne in gravidanza, causando gravi difetti di sviluppo nei neonati. Questo accadde perché il modello animale utilizzato non riuscì a rilevare gli effetti teratogeni del farmaco, mentre in altre specie animali si verificarono accumuli che causarono danni al feto.

Le direttive 63-2010 e 26-2014 regolamentano la sperimentazione animale, stabilendo che le procedure devono essere eseguite sugli animali anestetizzati anziché su animali svegli e coscienti. Si cerca di preservare il benessere dell'animale e evitarne lo stress (D-stress), promuovendo invece una condizione di stress positivo (Eu-stress). L'Eu-stress si verifica quando riconosciamo la fonte di un danno e sappiamo che esiste un rimedio. Al contrario, il D-stress si manifesta quando l'animale viene sottoposto a restrizioni e manipolazioni dolorose, causando stress continuo e potenzialmente portando alla depressione.

I modelli animali sono ampiamente utilizzati nella ricerca biomedica e non si limitano solo al topo. Anche vermi, *Drosophila* e pesci (come lo zebrafish) possono essere utilizzati come modelli sperimentali. I topi sono comunemente utilizzati come modelli perché condividono molte caratteristiche genetiche con gli esseri umani, consentendo di comprendere i geni stabili, l'espressione genica e le vie metaboliche. Sono inoltre impiegati per lo studio del sistema immunitario, poiché sono considerati animali con un sistema nervoso meno sviluppato rispetto ad altri animali, come i conigli, che non possono più essere utilizzati a causa di restrizioni etiche. Si ritiene che i topi provino dolore e manifestino empatia, e le relazioni empatiche tra madre e figlio sono evidenti. Gli animali sono capaci di empatia.

Per scegliere il modello le strade sono due: si fa una ricerca bibliografica per capire se qualcuno ha già utilizzato, su quel determinato substrato, un modello sperimentale, oppure si studiano tutti i modelli sperimentali per trovare quello che ha caratteristiche simili all'uomo. Un modello sperimentale umanizzato consiste nell'impiantare un modello osseo umano in un animale, distruggendo completamente il suo modello osseo originale, al fine di rendere i livelli ematici del modello animale simili a quelli umani.

Nella valutazione del modello animale, il peso del topo viene monitorato settimanalmente. Se il topo perde peso, indica che non sta mangiando e la principale causa di questo comportamento è lo stress. Pertanto, viene assegnato un punteggio da 0 a 3 in base al peso, simile alla valutazione dello stato di salute di un neonato mediante il punteggio di Apgar. Vengono controllati anche la dilatazione delle pupille, la presenza di secrezioni, la temperatura, la frequenza cardiaca e il comportamento in seguito a un contatto, come il suono di squittio e la toelettatura. Dopo aver calcolato i punteggi individuali, si ottiene un punteggio finale che può rientrare in diversi range: da 0 a 5 indica un'ottima salute, da 6 a 10 richiede un controllo quotidiano, da 11 a 14 indica un rischio di perdita dell'animale e si consiglia vivamente di fornire una gabbia più confortevole con elementi di intrattenimento, mentre da 15 a 18 indica che l'animale è irrecuperabile e deve essere sacrificato. ***È obbligatorio per legge arricchire le gabbie per ridurre la monotonia e lo stress degli animali. I tubi idraulici sono spesso utilizzati per l'arricchimento e per lo spostamento dei topi senza contatto diretto. Inoltre, i topi amano rosicchiare oggetti di varia natura, come gli sdrucchioli di legno, che possono fungere da distrazione nella gabbia.***

Esistono normative riguardanti le sperimentazioni sugli animali che devono essere seguite. Il prelievo di animali dal loro habitat naturale per scopi scientifici senza autorizzazione può comportare una condanna da 7 a 13 anni di carcere per maltrattamento animale. È importante che il progetto di ricerca sia veritiero e coerente con quanto dichiarato. Se si modificano le procedure senza adeguata comunicazione, si rischiano ammende o addirittura il carcere in caso di morte dell'animale. Le sperimentazioni sugli animali devono essere condotte secondo le direttive europee 63/2010 e il decreto legislativo 66/2014, che richiedono la presentazione di un progetto con un linguaggio semplice e la consultazione delle associazioni di categoria. ***Poiché i risultati ottenuti sui topi sono considerati validi anche per gli esseri umani, il topo è considerato un valido modello per la ricerca oncologica.***

Ogni risultato ottenuto dalle sperimentazioni deve essere di qualità, sia qualitativa che quantitativa. I dati sono considerati di qualità quando sono statisticamente significativi e l'errore, ovvero le situazioni in cui il risultato ottenuto è diverso, è molto limitato.

Nelle sperimentazioni oncologiche sugli animali, per valutare la qualità del risultato, vengono considerati diversi aspetti:

- La presenza di massa viene verificata mediante **test istologici**.
- Le variazioni nell'espressione genica vengono valutate attraverso **test genici**.
- Le alterazioni del metabolismo vengono analizzate mediante **metabolomica**.

Per evitare di sacrificare un numero eccessivo di animali, è importante sfruttare completamente ogni animale disponibile e, se necessario, congelare parti del loro corpo.

Viene introdotto il concetto di **"germ-free"**, che si riferisce a un animale che non è mai stato esposto a virus, batteri o pulviscolo. I **"patogen-free"** sono animali mantenuti in ambienti asettici in cui non vengono rilevati nemmeno i batteri normalmente presenti nella bocca e nell'intestino dei topi, come tetano e difterite. Pertanto, coloro che lavorano con gli animali devono immunizzarsi contro il tetano e verificare il livello di anticorpi per la difterite.

I roditori utilizzati nei laboratori non si limitano solo a topi e ratti, ma ci sono molte altre specie. Il topo più comunemente utilizzato è il *mus musculus*, mentre per i ratti l'unico utilizzato come linea di ricerca è il ratto norvegicus. Per i criceti, vengono spesso utilizzati l'*auratus*, amichevole e utilizzato per test di immunologia e oncologia, e l'*ungiculatus*, meno consigliato a causa del suo comportamento mordace e delle lunghe unghie. Infine, la cavia, nota anche come porcellino d'India, ha la peculiarità di nascere sessualmente maturo. Ogni linea di topo ha una specie specifica. Una delle linee più comuni è il C57BL/6, ma ci sono anche altre linee come il BALB-C, il CD-1 e molte altre, ognuna con le proprie sottolinee e ceppi.

Nell'allevamento di modelli sperimentali, l'obiettivo è ottenere risultati di qualità e quantità. Le **"linee inbred"** sono utilizzate per avere animali clonati riducendo le diversità nel sistema di istocompatibilità attraverso accoppiamenti consanguinei fino alla 21a generazione. Ciò porta a cloni con identico background genetico. Successivamente, vengono somministrate diverse concentrazioni di farmaci a questi cloni. Questi accoppiamenti tra consanguinei vengono chiamati "inbred".

Una volta che si conosce la concentrazione esatta del farmaco su una determinata linea di topo, questa variabile viene eliminata. Tuttavia, poiché in natura non siamo tutti uguali e ognuno di noi ha un ceppo genetico diverso, si utilizzano animali non consanguinei per creare una linea chiamata **"outbred"**. In questo caso, l'unica variabile è la diversità genetica negli animali, e si studia se questa variabile genica può influenzare la crescita tumorale. C'è anche una terza generazione chiamata "ibridi", ottenuti incrociando due diverse linee "inbred" e somministrando una concentrazione x della sostanza alle prime tre generazioni figlie.

La fase clinica di sviluppo di un farmaco passa attraverso quattro fasi. Prima di iniziare la sperimentazione sugli esseri umani, il composto viene testato sugli animali per valutarne la tossicità. Le fasi sono le seguenti:

1. Fase dei malati terminali: viene condotta su pazienti in fase avanzata di malattia, che hanno provato altre terapie senza successo.
2. Fase su soggetti sani e malati appena diagnosticati: mira a identificare nuovi effetti collaterali del farmaco.
3. Fase su grandi popolazioni con caratteristiche genetiche diverse: si cerca di includere individui con vari background genetici per valutare l'efficacia del farmaco in diverse popolazioni.
4. Fase su una vasta popolazione: una volta completate le fasi precedenti, il farmaco viene testato su un'ampia popolazione e successivamente viene messo in commercio.

Le fasi cliniche possono essere in parte simulate utilizzando animali. Nella fase uno, gli animali utilizzati corrispondono agli "inbred", cioè animali con uno stesso ceppo genetico. La malattia viene replicata e studiata in modo da creare un gruppo uniforme e omogeneo.

Nella fase due, si utilizzano animali di ceppi diversi ma all'interno della stessa popolazione, mantenendo una concentrazione stabile del farmaco.

Gli "outbred" invece rappresentano grandi popolazioni di animali con diversità genetica, poiché ogni accoppiamento è diverso e introduce una grande variabilità genetica. Questo permette di condurre una vera analisi preclinica che fornisce informazioni sull'effetto del farmaco nell'uomo.

Gli allevamenti di "inbred", ottenuti attraverso incroci tra consanguinei per un massimo di 20-25 generazioni, sono altamente compatibili geneticamente (98% di compatibilità HLA). È necessario programmare e registrare attentamente gli accoppiamenti, poiché l'accoppiamento tra consanguinei può portare allo sviluppo di malattie specifiche della linea cellulare animale.

Le linee outbred sono caratterizzate da una maggiore diversità genetica rispetto alle linee inbred, poiché si cerca di rompere i legami di parentela. Ciò porta a prole robusta ed eterogenea, riducendo la variabilità genetica. Dopo circa la 15a generazione, le linee inbred generano solo 2-3 topolini per figliata, mentre se vengono incrociate con linee outbred, si ottengono figlie di 12/14 topolini.

Le linee ibride sono il risultato dell'incrocio tra linee inbred e outbred. Queste linee presentano una variabilità genetica inferiore rispetto alle linee outbred. Sono ampiamente utilizzate nella ricerca biomedica e biochimica e mostrano un alto tasso di riproduzione, grazie a un processo in cui gli animali sono inizialmente allevati in condizioni inbred con poca ovulazione, seguito da accoppiamenti in F2 che permettono un'iperovulazione e una numerosa prole. Dopo la creazione delle linee, sono possibili ulteriori incroci generazionali.

I modelli animali possono essere divisi in diverse categorie: **modelli animali indotti, modelli animali transgenici, modelli animali spontanei, modelli animali negativi e modelli animali orfani.**

I modelli animali indotti sono creati impiantando cellule o sostanze specifiche per indurre la malattia.

Gli animali transgenici sono creati mediante inserzioni genetiche nel loro corredo genetico. Le due famiglie principali sono i knock-in e i knock-out, in cui l'espressione di una proteina viene aumentata o spenta attraverso l'induzione genica. Questi modelli sono utili per studiare l'effetto dell'espressione o dello spegnimento di geni specifici nella sviluppo di malattie.

I modelli animali spontanei sono caratterizzati da mutazioni genetiche che si verificano naturalmente nella popolazione animale, come il ratto Fisher o il C57BL/6.

I modelli animali negativi sono specie animali che vengono esposte a virus o batteri specifici ma non sviluppano la malattia corrispondente.

I modelli orfani sono caratterizzati da malattie che si verificano negli animali ma non negli esseri umani. Ad esempio, l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE) colpisce solo gli animali, mentre negli esseri umani causa una grave malattia. Questi modelli sono chiamati orfani perché la malattia è unica nell'uomo.

Nel caso dei tumori solidi derivanti da cellule umane, possono essere indotti in siti specifici. Possono essere impiantati in una regione ectopica, che è diversa dalla sede di origine delle cellule (ad esempio, impianto di cellule mammarie nella regione intrascapolare), oppure nella sede di origine stessa (impianto ortotopico). L'impianto ortotopico è importante per valutare se il microambiente tumorale sostiene o meno la formazione del tumore.

TRANSIGENESI: Ci sono diverse tecniche di transgenesi, tra cui la microiniezione del DNA esogeno nello zigote, la microiniezione/infezione di cellule staminali, il "Nuclear Transfer" di cellule staminali embrionali trasformate in vitro, la transgenesi mediata da retrovirus, la transgenesi mediata da spermatozoi e la transgenesi ICSI.

La microiniezione nello zigote è la tecnica più comune per apportare modifiche genetiche lievi. Coinvolge l'accoppiamento di un topo maschio e femmina, seguito dal sacrificio della femmina quando viene rilevato il tappo vaginale. Gli embrioni vengono quindi estratti dalle tube e studiati al microscopio. Utilizzando un microiniettore, il costrutto genetico viene iniettato nel pronucleo maschile dello zigote. Successivamente, l'embrione viene reimpiantato in una topolina pseudogravida, e si attende per vedere se viene prodotto un animale transgenico. Questo processo richiede precisione e lavorare sotto vuoto per evitare contaminazioni genetiche.

La microiniezione/infezione di cellule staminali (ES) coinvolge il trattamento delle cellule staminali in una piastra e la loro reimpiantazione in blastocisti. Le blastocisti vengono prese nella fase pre-annidamento dell'endometrio. Le prime cellule staminali vengono isolate entro 24 ore e il costrutto genetico viene introdotto all'interno delle cellule utilizzando vettori come liposomi, virus o elettroporazione. Per verificare se il costrutto è entrato nelle cellule, viene aggiunta una resistenza come la neomicina. Le cellule che non possiedono la resistenza alla neomicina muoiono, mentre quelle che la possiedono sopravvivono, indicando che il costrutto è stato inserito. Un'altra opzione è inserire una proteina fluorescente nel costrutto per identificare le cellule transgeniche. Una volta isolate le linee cellulari transgeniche, vengono amplificate e reinserite in blastocisti. Questa tecnica può generare chimere, in cui alcuni tessuti o linee cellulari contengono il costrutto mentre altri no. Per aumentare la selettività e ottenere animali transgenici, è necessario incrociare gli animali tra loro, spesso utilizzando l'inbred.

LA DIALISI (ancora): è una procedura che elimina sostanze tossiche dal sangue e mantiene l'equilibrio elettrolitico utilizzando membrane semipermeabili. Il sangue del paziente viene prelevato e fatto circolare in una pompa, dove viene filtrato attraverso una membrana di dialisi in uno scambio controcorrente con un liquido di dialisi. Questo processo purifica il sangue e garantisce la cura necessaria al paziente. Tuttavia, ci sono anche aspetti negativi, come restrizioni dietetiche e limitazioni nell'assunzione di liquidi a causa delle difficoltà nel urinare. Il medico determina la durata, la frequenza del trattamento e la composizione del liquido di dialisi. La seduta dialitica viene somministrata secondo linee guida basate su calcoli matematici, come il rapporto Kt/V che deve essere compreso tra 1.2 e 1.4, dove K rappresenta la clearance del filtro, t è il tempo di filtraggio e V è la distribuzione volumetrica dell'urea.

Ci sono quattro tipi di dialisi: convenzionale intermittente, lunga intermittente, breve quotidiana e lunga quotidiana notturna. Le tossine uremiche, che sono prodotti di scarto accumulati nell'insufficienza renale, si dividono in diverse categorie. Durante il trattamento dialitico, si osserva un abbassamento della concentrazione delle tossine durante il periodo dialitico, mentre si riavvicina al picco durante il periodo interdialitico.

I meccanismi della dialisi includono l'ultrafiltrazione, che sposta i liquidi attraverso una membrana semipermeabile utilizzando differenze di pressione idrostatica; la convezione, che trasporta acqua e tossine uremiche attraverso differenze di pressione; la diffusione, che permette il passaggio dei soluti attraverso la membrana; e l'assorbimento, che coinvolge l'utilizzo di altre sostanze chimiche. Di solito, sia la convezione che la diffusione sono sfruttate nella dialisi mediante il controllo della porosità dei filtri dialitici. Il processo di diffusione dei soluti attraverso la membrana del filtro dializzatore segue la legge di Fick.

L'ESTRAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI è un processo utilizzato per ricercare biomarcatori genomici che aiutano nello studio delle patologie. Le mutazioni a livello genomico e le alterazioni cromosomiche possono fornire informazioni sullo sviluppo e i meccanismi molecolari di una malattia, nonché identificare molecole bersaglio e sviluppare farmaci mirati. La medicina sta diventando sempre più personalizzata, adattando i trattamenti alle caratteristiche genetiche individuali.

La reazione a catena della polimerasi quantitativa (PCR quantitativa o PCR in tempo reale) viene utilizzata per misurare l'espressione genica. L'espressione di un gene è mediata dalla sua proteina tradotta. Alcune mutazioni a livello genico non influenzano direttamente la proteina, consentendo comunque la sua funzionalità. Tuttavia, le mutazioni che causano l'assenza, un'errata espressione o un'alterazione della proteina, specialmente nel suo sito catalitico, possono avere effetti negativi sulla sopravvivenza cellulare.

Esistono due tipi di mutazioni: somatiche, che si verificano nelle cellule del corpo e si perdono alla morte della cellula, e germinali, che coinvolgono le cellule sessuali e possono essere ereditate nelle generazioni successive. Le mutazioni possono essere individuate non solo a livello del gene o del DNA, ma anche a livello dell'RNA. I microRNA possono agire come oncogeni o oncosoppressori, influenzando l'espressione di geni coinvolti nella crescita cellulare e nella progressione tumorale. Alterazioni nell'espressione dei microRNA sono responsabili di diverse patologie, incluso il diabete e le alterazioni del metabolismo dei carboidrati.

Per l'estrazione degli acidi nucleici, è necessario ottenere il materiale biologico di partenza, che può essere di diversa natura, come tessuti animali, cellule vegetali, cellule eucariotiche, cellule procariotiche, virus e anche fluidi biologici come il sangue. La scelta del metodo di estrazione dipende dal tipo di materiale e dall'acido nucleico che si desidera estrarre. Ad esempio, l'estrazione di microRNA richiede un approccio specifico a causa della loro degradabilità.

È importante ottenere acidi nucleici di elevata purezza, privi di contaminazioni proteiche o agenti estrattivi, e la scelta del metodo di estrazione dipende anche dalla quantità e dalla qualità dell'acido nucleico desiderato. La PCR in tempo reale richiede una minima quantità di DNA per la visualizzazione, mentre per la PCR tradizionale è richiesta una concentrazione 10-100 volte maggiore per ragioni di sensibilità.

ISOLAMENTO ACIDI NUCLEICI: Il processo di isolamento degli acidi nucleici comprende tre fasi: lisi cellulare, deproteinizzazione e concentrazione. Durante la lisi cellulare, le cellule vengono rotte per separare gli acidi nucleici da altre componenti come proteine e detriti cellulari. Esistono **metodi meccanici** come l'omogenizzazione e le vibrazioni ultrasoniche, così come **metodi non meccanici** come il congelamento/scongelo e lo shock osmotico. Gli agenti litici come il lisozima possono essere utilizzati per rompere la parete cellulare. La rottura cellulare può essere gestita anche attraverso il congelamento graduale con l'uso di un crioconservante.

È importante evitare la contaminazione dei materiali usati per l'analisi degli acidi nucleici, quindi, vengono preferiti materiali inerti come i microchip anziché il legno o la plastica. Durante l'omogeneizzazione, viene utilizzato un mezzo che preserva gli acidi nucleici o le proteine, che è isotonic e tamponato.

Il pH di una soluzione è importante per garantire il corretto funzionamento dei reagenti e la salute degli organi. La rottura delle cellule è necessaria per separare gli elementi cellulari attraverso l'ultracentrifugazione e la centrifugazione. Vengono utilizzati inibitori di proteasi per evitare la degradazione delle proteine durante l'estrazione. A seconda dell'obiettivo desiderato, può essere applicata una lisi blanda o spinta, utilizzando sostanze come il Triton e il lisozima per la lisi blanda (È possibile isolare solo DNA plasmidico mentre il DNA cromosomiale rimane attaccato alla membrana interna) o detergenti anionici come SDS per la lisi spinta (le membrane vengono completamente frantumate).

LA DEPROTEINIZZAZIONE: è un processo essenziale per lavorare con gli acidi nucleici, come RNA e DNA. È necessario rimuovere le proteine che potrebbero contenere enzimi in grado di degradare gli acidi nucleici. La deproteinizzazione può essere effettuata utilizzando enzimi proteolitici, proteinasi K o una combinazione di cloroformio e alcol isoamilico. Il Trisol è un reagente utilizzato per il tamponamento che viene aggiunto alla coltura o al campione di tessuto. Successivamente, si aggiunge il cloroformio per rompere le cellule e il fenolo con un pH specifico che favorisce il recupero dell'RNA o del DNA desiderato. Dopo la miscelazione, si effettua una centrifugazione per separare le diverse fasi, con la fase acquosa contenente principalmente il DNA e l'interfaccia che contiene le proteine degradate. A seconda del pH del fenolo utilizzato, è possibile recuperare sia il DNA che l'RNA o ottenere una soluzione contenente solo

RNA. L'aggiunta di enzimi come la DNasi e la RNasi viene eseguita per degradare l'acido nucleico indesiderato e ottenere una soluzione il più pura possibile.

Successivamente, vengono effettuati test sull'espressione genica e proteica nella stessa piastra. La parte superiore viene estratta, facendo attenzione a evitare la parte contaminata delle proteine degradate. La soluzione di acido nucleico viene quindi centrifugata per concentrarla. Si utilizza quindi l'alcol isopropilico per precipitare l'acido nucleico e si aggiungono le proteasi corrispondenti. Infine, si rimuove il sovraetanolo e si sospende il pellet di DNA in un solvente a pH neutro o semplicemente in acqua. Si valuta quindi la concentrazione dell'acido nucleico estratto e la sua purezza per determinare la quantità recuperata e la presenza di eventuali contaminanti.

Lo spettrofotometro è il metodo più comune per determinare la concentrazione di acidi nucleici, come il DNA e l'RNA. Questo strumento utilizza sia dosaggi colorimetrici che ultravioletti. La soluzione contenente gli acidi nucleici viene posta in una cuvetta e attraversata da un fascio di luce ultravioletta. Quando la luce attraversa la soluzione, parte della sua intensità viene assorbita dalle particelle presenti. Misurando la variazione dell'intensità luminosa, è possibile calcolare la quantità di particelle nella soluzione utilizzando la legge di Lambert-Beer.

La concentrazione di acido nucleico viene determinata misurando l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm, che corrisponde al picco di assorbimento massimo per gli anelli aromatici delle basi azotate degli acidi nucleici. Di solito, una densità ottica corrisponde a una concentrazione di 50 mg/ml per il DNA e 40 mg/ml per l'RNA. Esiste un software che, basandosi sui dati inseriti, calcola la concentrazione corrispondente per una determinata densità ottica. Inoltre, lo strumento può fornire informazioni sulla purezza della soluzione di DNA o RNA. La purezza dipende dal rapporto tra la massa delle proteine e quella dell'acido nucleico. Una purezza ottimale ha un valore di 1,8 per il DNA e 2 per l'RNA. Valori inferiori indicano un'elevata presenza di proteine rispetto all'acido nucleico, il che può compromettere l'affidabilità dei risultati. Sono definiti range accettabili di purezza 1,7 o 1,8, mentre valori come 1,4, 1,5 o 1,6 non sono accettabili.

IL METODO COLORIMETRICO: utilizza la legge di Lambert e Beer per valutare la concentrazione di DNA o RNA, ma a differenza del metodo spettrofotometrico, si basa sul cambio di colore che avviene nella soluzione quando viene aggiunto un reagente specifico. Si utilizza la difenilammina per valutare il DNA, che produce un colore blu intenso, mentre per l'RNA si utilizza l'orcinolo, che produce un colore verde intenso. Tuttavia, il problema principale di questo metodo è il tempo necessario per sviluppare il colore, che richiede tutta la notte per raggiungere una saturazione specifica. Attualmente, il metodo colorimetrico non viene più utilizzato, e nemmeno le cuvette, ma viene impiegato il Nanodrop, un dispositivo costoso ma che permette di risparmiare molto tempo. Con il Nanodrop, vengono prelevati direttamente 2 microlitri della soluzione e inseriti in un'apposita area di misurazione, il quale determina immediatamente la purezza e altre informazioni sulla struttura. Per calcolare la concentrazione degli acidi nucleici, è necessario creare una curva di taratura utilizzando campioni con concentrazioni note di DNA o RNA. L'intensità colorimetrica è direttamente proporzionale alla concentrazione degli acidi nucleici, e tramite l'interpolazione sulla curva di taratura, è possibile determinare la concentrazione di un campione sconosciuto.

IL METODO FLUORIMETRICO: invece, stima la concentrazione di acidi nucleici in base alla fluorescenza emessa dall'etidio bromuro. Si esegue una corsa elettroforetica su un gel, successivamente il gel viene immerso in una soluzione di etidio bromuro, che si lega all'acido nucleico rendendolo fluorescente alla luce UV. Si costruisce una curva di taratura utilizzando campioni con concentrazioni note di acido nucleico, e tramite l'interpolazione sulla curva, è possibile determinare la concentrazione di un campione sconosciuto.

In entrambi i metodi, il gel di agarosio viene utilizzato per separare e visualizzare gli acidi nucleici, e l'etidio bromuro viene utilizzato per evidenziarli. Il metodo fluorimetrico permette anche di valutare la purezza dell'estratto di acido nucleico e identificare eventuali degradazioni o contaminazioni.

LA PREPARAZIONE DEL cDNA implica la conversione dell'RNA in una molecola più stabile, il DNA complementare (cDNA), attraverso la retrotrascrizione. Questo cDNA può essere utilizzato per amplificare

specifiche sequenze tramite la PCR. Il controllo di questa reazione coinvolge l'utilizzo di trascrittasi inversa per confermare la retrotrascrizione e l'assenza di contaminazioni.

Un'altra modalità di estrazione dell'acido nucleico è L'ISOLAMENTO DEL DNA PLASMIDICO, che può essere eseguito in modo "artigianale" attraverso diversi passaggi come la lisi cellulare, estrazione fenolo/cloroformio e precipitazione con isopropanolo, seguiti da risospensione in un tampone.

Un'applicazione comune è il taglio controllato del DNA tramite enzimi di restrizione che riconoscono specifiche sequenze. Questo è utile, ad esempio, nello studio di patologie genetiche legate a mutazioni in siti di taglio enzimatico.

I gruppi metilici presenti nel DNA delle cellule ospiti proteggono il DNA dalla degradazione da parte dei propri enzimi di restrizione. Tuttavia, gli enzimi di restrizione possono ancora tagliare siti bersaglio nel DNA batterico o virale. Ci sono enzimi che tagliano estremità "adesive" (sticky ends) che possono essere facilmente riattaccate, e estremità "piatte" (blunt ends) utilizzate per clonaggio. Il DNA estratto può essere separato dal gel e utilizzato per il sequenziamento genetico. Dopo l'elettroforesi, è possibile recuperare il frammento di DNA di interesse dal gel, scioglierlo, purificarlo mediante una resina che trattiene il DNA, rimuovere gli altri componenti del gel tramite lavaggio con sali ed etanolo, eliminare l'etanolo e infine risospendere il DNA in acqua.

Il trasferimento degli acidi nucleici su una membrana, noto come blotting, può essere eseguito utilizzando diverse varianti. Nel caso del **SOUTHERN BLOTTING**, il trasferimento avviene per capillarità senza l'uso di corrente. Il DNA o l'RNA instabile vengono trasferiti verticalmente dal gel di agarosio a una membrana attraverso un tampone di trasferimento, con l'aiuto di carta da filtro e tovaglioli di carta assorbente che richiamano il tampone per capillarità. La membrana trattiene le molecole di DNA che non sono permeabili alla stessa. Prima del trasferimento, il DNA nel gel viene sottoposto a trattamenti con soluzioni acide e alcaline per depurinazione e denaturazione, seguiti da una soluzione neutralizzante. Dopo il trasferimento, gli acidi nucleici vengono fissati sulla membrana, di solito utilizzando raggi UV o riscaldamento a 80°C.

Successivamente, la membrana viene immersa in una soluzione contenente RNA o DNA a singolo filamento o oligonucleotidi marcati che sono complementari alla sequenza bersaglio desiderata. Le condizioni di ibridazione vengono selezionate per massimizzare il legame tra la sonda e il bersaglio specifico, riducendo il legame non specifico. L'eccesso di sonda non legata viene eliminato mediante lavaggi. Il legame tra la sonda e il bersaglio viene rivelato mediante autoradiografia o altri metodi di rilevamento.

Il **NORTHERN BLOTTING** segue una procedura simile al Southern blotting, ma viene utilizzato per analizzare l'RNA. Dopo la corsa su un gel di agarosio denaturante, l'RNA denaturato viene trasferito su una membrana di nylon e sottoposto a immobilizzazione, ibridazione con una sonda marcata e rilevazione.

In sintesi, il Southern blotting viene utilizzato per analizzare il DNA, mentre il Northern blotting viene utilizzato per analizzare l'RNA. Entrambi i metodi consentono di identificare specifiche sequenze di acidi nucleici mediante ibridazione con sonde complementari. Il Southern Blotting è un metodo utilizzato per rilevare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA. Questo metodo è complesso e richiede l'uso di marcatori radioattivi, come il fosforo-32, per marcare la sonda utilizzata. Tuttavia, la PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) supera questa limitazione poiché consente di amplificare in modo specifico una regione target del DNA, eliminando la necessità di utilizzare marcatori radioattivi. Grazie alla PCR, è possibile selezionare e amplificare esponenzialmente la regione target desiderata utilizzando primer specifici.

La PCR trova applicazione in diverse aree, tra cui la ricerca di mutazioni genetiche, lo studio di alterazioni oncogeniche e oncosoppressorie, l'analisi prenatali per la determinazione del sesso del feto, il test di paternità, la determinazione dei portatori di malattie genetiche in famiglie a rischio, la diagnosi di malattie infettive come l'HIV e l'epatite, l'identificazione genetica in medicina forense, lo studio del DNA antico (come nelle mummie) e il recupero di DNA da campioni rari in ambito paleontologico o archeologico. La PCR offre diverse varianti metodologiche che vengono utilizzate nei laboratori di genetica per l'identificazione di specifiche mutazioni genetiche note.

Nel 2003, il **PROGETTO GENOMA UMANO** ha portato al completamento del sequenziamento del genoma umano, fornendo importanti informazioni sull'identificazione e la caratterizzazione dei geni coinvolti nello sviluppo e nella predisposizione a numerose malattie monogeniche, causate da alterazioni in singoli geni. Finora sono stati identificati circa 17.000 dei 35.000 geni umani stimati, di cui 1.700 sono associati all'insorgenza di malattie ereditarie o sporadiche, noti come geni-malattia.

I progressi nella biologia molecolare hanno permesso di identificare e caratterizzare le alterazioni molecolari delle malattie monogeniche. Queste conoscenze hanno avuto un impatto significativo nella diagnosi e nella prevenzione di queste malattie, consentendo di individuare i portatori di mutazioni genetiche all'interno di una popolazione o famiglia. La medicina molecolare predittiva o personalizzata si basa sulla costituzione genetica di un individuo per fornire stime del rischio di sviluppare una determinata malattia.

La diagnosi delle malattie genetiche si avvale di due approcci: un approccio **indiretto** basato sull'analisi di linkage, che viene utilizzato quando si conosce solo la localizzazione del gene malattia nel genoma, e un approccio **diretto** che si basa sull'identificazione dei numerosi geni-malattia noti.

Nella **diagnosi diretta** delle malattie genetiche, vengono utilizzati diversi metodi a seconda della presenza di una specifica mutazione nota del DNA, del numero limitato di mutazioni note associate a una patologia, dell'eterogeneità molecolare della malattia (con molte mutazioni diverse responsabili dell'insorgenza) o della presenza di mutazioni non ancora identificate. Queste indagini sfruttano l'amplificazione del DNA mediante la PCR (Reazione a Catena della Polimerasi), sia in modo indiretto che diretto. L'amplificazione del DNA mediante PCR è una tecnica fondamentale utilizzata nelle indagini genetiche per la diagnosi delle malattie genetiche.

La tecnica della PCR offre vantaggi significativi per lo studio delle alterazioni genetiche, grazie alla sua rapidità, elevata specificità e sensibilità. La PCR viene utilizzata come metodo iniziale per ulteriori indagini post-PCR o come strumento di indagine diretta.

NELL'ANALISI POST-PCR, diversi metodi sono stati sviluppati per l'identificazione di mutazioni note del DNA. L'utilizzo di campioni di DNA amplificati mediante PCR fornisce un importante vantaggio in termini di risoluzione e sensibilità delle analisi successive. Ad esempio, sostanze fluorescenti o chemiluminescenti possono essere utilizzate per la rilevazione al posto degli isotopi radioattivi, riducendo i rischi per l'operatore e i problemi di smaltimento dei rifiuti radioattivi.

Un metodo semplice e immediato per l'identificazione di mutazioni note è l'analisi di restrizione. Questa tecnica si basa sulla digestione, tramite enzimi di restrizione, di una specifica sequenza di DNA precedentemente amplificata mediante PCR. L'esito della digestione viene analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio o poliacrilamide. L'analisi di restrizione viene utilizzata per l'identificazione di mutazioni puntiformi, come sostituzioni nucleotidiche, piccole inserzioni o delezioni.

Se una **mutazione puntiforme** crea o elimina un sito di restrizione, è possibile rilevare la mutazione tramite la digestione del campione di DNA amplificato con l'enzima di restrizione corrispondente. L'analisi elettroforetica dei frammenti ottenuti permette di valutare la presenza della mutazione e se è in omozigosi o eterozigosi. Nel caso in cui la mutazione inserisca un sito di restrizione, il campione di un soggetto sano non presenterà il sito di restrizione e mostrerà un'unica banda corrispondente alla sequenza amplificata. Se entrambi gli alleli sono mutati, saranno presenti due bande. Nel caso in cui la mutazione non sia presente, il frammento amplificato verrà digerito dall'enzima di restrizione e si avranno due bande. Questa tipologia di indagine, che può essere utilizzata per diagnosticare malattie come l'anemia falciforme, è veloce, con una durata media di un'ora per la digestione con gli enzimi di restrizione. Nel caso dell'anemia falciforme, una singola sostituzione nucleotidica crea o elimina un sito di restrizione per l'enzima DDE primo, permettendo la sua identificazione mediante PCR seguita dalla digestione con questo enzima. *In sintesi, l'analisi di restrizione post-PCR rappresenta un metodo efficace per l'identificazione di mutazioni genetiche note, consentendo una valutazione rapida e precisa della presenza di mutazioni puntiformi.*

Nel caso in cui la tecnica di analisi di restrizione non sia applicabile per identificare mutazioni genetiche, si può utilizzare un approccio con **PRIMER MUTAGENICI** durante la reazione di PCR. Un primer mutagenico è un primer che differisce dalla sequenza complementare per una singola base e può inserire

artificialmente un sito di restrizione desiderato durante l'amplificazione. Questo metodo è sensibile e utile per individuare mutazioni specifiche, anche in popolazioni cellulari limitate come nei casi di neoplasie. Dopo l'amplificazione mediante PCR, l'amplificato viene sottoposto all'azione di un enzima di restrizione e i frammenti risultanti vengono separati mediante elettroforesi su gel.

Nel caso di un soggetto normale in cui è stato inserito il sito di restrizione, si formano tre frammenti, ma due di essi sono troppo piccoli per essere visualizzati sul gel. Pertanto, sul gel sarà visibile solo una banda corrispondente al frammento più lungo. Nel caso di un DNA mutato, oltre ai tre frammenti, si formerà un quarto frammento più lungo, poiché il sito di restrizione inserito artificialmente è assente.

In conclusione, l'approccio con primer mutagenici durante la PCR permette di individuare mutazioni anche in popolazioni cellulari limitate, consentendo di visualizzare pattern di restrizione diversi tra soggetti normali e portatori della mutazione.

L'ASO PCR: (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction) è un metodo utilizzato per la ricerca di mutazioni puntiformi note. Si basa sull'ibridazione tra il DNA amplificato tramite PCR e delle sonde oligonucleotidiche specifiche chiamate sonde ASO (Allele-Specific Oligonucleotide). Queste sonde sono brevi sequenze oligonucleotidiche, lunghe tra 15 e 20 paia di basi, progettate per appaiarsi in condizioni di stringenza con la sequenza bersaglio in modo specifico.

L'ASO PCR prevede diversi passaggi:

1. Vengono disegnate due sonde diverse, una specifica per l'allele normale e una specifica per la sequenza mutata.
2. Il DNA bersaglio contenente la mutazione viene amplificato utilizzando specifici primer e il prodotto amplificato viene denaturato e trasferito su un filtro di nylon o nitrocellulosa.
3. Il campione amplificato viene ibridato con le due diverse sonde. I risultati vengono rilevati attraverso la visualizzazione degli "spot" di ibridazione. Ci sono tre possibili risultati:
 - a. Se l'ibridazione è osservabile solo con la sonda normale, significa che non vi è presenza di mutazione.
 - b. Se l'ibridazione è osservabile solo con la sonda mutata, significa che il soggetto è omozigote per la mutazione.
 - c. Se si osserva l'ibridazione sia con la sonda normale che con la sonda mutata, indica la presenza della mutazione in eterozigosi.

Questo approccio può essere utilizzato per identificare mutazioni ben definite, come quelle responsabili della beta-talassemia. Nel caso in cui la patologia presenti una grande eterogeneità molecolare, viene impiegato un set di sonde specifiche per diverse mutazioni presenti, evitando la necessità di successive ibridazioni.

Esistono kit commerciali che consentono l'analisi di mutazioni nel gene CFTR, responsabili della fibrosi cistica. In questo caso, sulla striscia di nitrocellulosa viene visualizzata una striscia inferiore di sangue e le sonde per le mutazioni nella parte superiore, consentendo una diagnosi rapida.

La OLA PCR: (Oligonucleotide Ligation Assay Polymerase Chain Reaction) è una metodica che si basa sull'uso di sonde oligonucleotidiche per la rilevazione di mutazioni. In questo saggio, l'amplificazione del campione tramite PCR viene combinata con un'analisi di ligazione delle sonde oligonucleotidiche.

La OLA PCR utilizza un enzima chiamato DNA ligasi, che è termostabile e in grado di legare due sequenze oligonucleotidiche, ovvero due sonde, solo se sono perfettamente appaiate a una sequenza bersaglio complementare. Vengono utilizzate tre diverse sonde nella OLA PCR, di cui due sono specifiche per l'allele (sequenza) normale e mutato, e sono caratterizzate da un'estremità 3' che corrisponde esattamente al sito della mutazione. Le sonde sono anche coniugate a modificatori di mobilità nell'estremità 5', che consentono di differenziare i prodotti di ibridazione durante l'elettroforesi successiva.

Il DNA amplificato mediante PCR viene fatto reagire con queste sonde e viene aggiunta l'enzima ligasi, che unisce le due sonde (specifiche per l'allele normale e mutato) solo se sono perfettamente appaiate alla sequenza complementare.

I risultati vengono visualizzati attraverso l'elettroforesi capillare su un sequenziatore automatico, un dispositivo sofisticato che rielabora i risultati e fornisce un grafico dei prodotti di amplificazione separati durante l'elettroforesi. I prodotti di amplificazione (sonde) possono essere distinti sia in base alle dimensioni che al diverso fluorocromo utilizzato. Questo permette di monitorare contemporaneamente la presenza di un numero importante di mutazioni, variando la lunghezza dei modificatori di mobilità e il fluorocromo utilizzato.

Nonostante sia una tecnica costosa, la OLA PCR è efficiente e veloce. Viene utilizzata come tecnica di screening di primo livello per la rilevazione delle mutazioni più comuni associate alla fibrosi cistica e aumenta la sensibilità delle tecniche diagnostiche.

L'ARMS PCR: (Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction) è una tecnica diagnostica basata sull'amplificazione del DNA che utilizza primer allele-specifici. Questa tecnica si basa sul principio che un primer che non è perfettamente appaiato alla sequenza bersaglio nel suo estremo 3' non può essere esteso dalla DNA polimerasi durante la sintesi del filamento.

Nell'ARMS PCR vengono utilizzati due primer, uno specifico per la sequenza normale e l'altro specifico per la sequenza mutata. I primers vengono progettati in base alle mutazioni conosciute. Il secondo primer, chiamato Reverse, è comune a entrambe le sequenze.

Per ogni campione, vengono allestite due reazioni di PCR:

1. Nella prima reazione, viene utilizzato il primer comune insieme al primer specifico per la sequenza normale.
2. Nella seconda reazione, viene utilizzato il primer comune insieme al primer specifico per la sequenza mutata.

Dopo la PCR, i prodotti amplificati vengono analizzati mediante elettroforesi su gel, e la presenza o l'assenza della mutazione viene determinata in base alle reazioni di amplificazione.

Le possibili situazioni sono le seguenti:

- Se l'amplificazione avviene solo nella reazione in cui è stato utilizzato il primer specifico per la sequenza normale e non in quella con il primer specifico per la sequenza mutata, significa che non c'è mutazione.
- Se si ha amplificazione solo nella reazione in cui è stato utilizzato il primer specifico per la sequenza mutata, il soggetto è omozigote per la mutazione cercata.
- Se si ha amplificazione in entrambe le reazioni di PCR, significa che il soggetto è eterozigote per la mutazione.

L'ARMS PCR è una tecnica diretta e veloce che consente l'analisi di un elevato numero di campioni contemporaneamente. Tuttavia, ha il limite di poter analizzare solo un pannello di mutazioni limitato, in quanto è difficile trovare le condizioni di amplificazione ottimali per un elevato numero di coppie di primer nella stessa reazione.

La PCR può essere utilizzata per rilevare riarrangiamenti genomici come duplicazioni, espansioni o delezioni, e per identificare mutazioni dinamiche del DNA. Le mutazioni dinamiche sono caratterizzate da ripetizioni eccessive di triplette nucleotidiche in determinate sequenze genetiche. Queste mutazioni possono iniziare come pre-mutazioni e diventare sempre più ampie nel corso delle generazioni, fino a diventare mutazioni complete. Ad esempio, le mutazioni nel gene del recettore degli androgeni sono responsabili dell'atrofia spino-bulbare.

Per rilevare queste mutazioni, è possibile amplificare il gene di interesse utilizzando primer che si appaiano alle estremità della sequenza nucleotidica, in quanto la sequenza prima e dopo la ripetizione è identica. Successivamente, i prodotti amplificati vengono analizzati mediante elettroforesi su gel per valutare la presenza di bande di dimensioni diverse. La presenza di una banda più grande indica la presenza della mutazione con un numero di ripetizioni superiore al normale, mentre una banda di dimensioni inferiori indica l'assenza della mutazione.

Questo approccio viene utilizzato per diagnosticare la **malattia di Huntington**, che è causata da un'eccessiva ripetizione della tripletta CAG nel gene IT-15. Allo stesso modo, la tecnica può essere applicata per la **sindrome dell'X fragile**, che è legata alla presenza di ripetizioni sovrannumerarie della tripletta CGG. Tuttavia, a causa della lunghezza eccessiva delle sequenze mutanti nella sindrome dell'X fragile, non è possibile utilizzare la PCR, ma è necessario ricorrere a una metodica chiamata Southern blot, che prevede la digestione del DNA genomico del paziente con un enzima di restrizione e l'analisi successiva. La delezione di esoni è associata a diverse patologie, come la **distrofia muscolare**, e può essere facilmente identificata quando la mutazione è presente in omozigosi. Per individuare la delezione di uno o più esoni di un gene specifico, è possibile amplificare il DNA del paziente utilizzando primer che corrispondono agli inizi e alle fine degli esoni. La presenza della mutazione sarà indicata dall'assenza del prodotto di amplificazione, poiché i primer non troveranno la sequenza corrispondente all'esone mancante. Questo approccio viene utilizzato, ad esempio, per diagnosticare la distrofia muscolare di Duchenne, dove l'analisi della delezione di 9 esoni è sufficiente per diagnosticare il 90% delle delezioni coinvolte nella malattia.

Tuttavia, questo approccio è valido solo quando le delezioni sono presenti in omozigosi o negli individui di sesso maschile. Nei casi di eterozigosi, in cui è presente un allele mutato con delezione di un esone e un allele normale, la PCR classica potrebbe dare un falso negativo perché i primer rileveranno comunque la presenza dell'allele normale. Per discriminare la delezione in eterozigosi, è necessario utilizzare la PCR quantitativa in tempo reale, che può rilevare la presenza della delezione come una riduzione del 50% rispetto alla situazione normale.

La PCR classica è una tecnica qualitativa molto utile per determinare la presenza o l'assenza di una sequenza target con alta specificità e ottenere una quantità sufficiente di tale sequenza per ulteriori analisi. Tuttavia, nella PCR classica, dopo circa 30 cicli, si perde la linearità dell'amplificazione e la quantità di amplificato non corrisponde più linearmente alla quantità di acido nucleico iniziale.

La PCR trova anche applicazione nella genetica medica per individuare mutazioni puntiformi e riarrangiamenti genomici nella sequenza primaria del DNA. Tuttavia, la PCR non è utile per rilevare riarrangiamenti in eterozigosi su loci autosomici dominanti o loci legati al cromosoma X. Per discriminare la delezione genica come una riduzione del 50% rispetto alla situazione normale o la duplicazione genica come un aumento del 50% o più, è necessario utilizzare la PCR quantitativa in tempo reale o **Real Time PCR**. Questa tecnica consente di determinare in tempo reale la quantità di acido nucleico presente nel campione biologico in esame.

La Real Time PCR è uno strumento essenziale nella diagnostica virale per rilevare e identificare la presenza di un virus in un campione biologico. L'approccio diagnostico classico include sia l'accertamento **indiretto** che quello **diretto**. L'accertamento **indiretto** si basa sull'analisi del siero del paziente utilizzando metodi immunologici per rilevare la presenza di anticorpi specifici diretti contro il virus. L'accertamento **diretto**, invece, si concentra sulla visualizzazione, l'isolamento e l'identificazione del virus utilizzando tecniche di microscopia elettronica, colture cellulari e immunodosaggi per determinare l'antigene virale.

Tuttavia, i metodi classici presentano alcune **limitazioni**. L'esame microscopico diretto è poco sensibile e specifico. L'isolamento in coltura rimane fondamentale per la diagnostica virale in quanto permette di verificare l'effettiva infettività del virus, ma richiede attrezzature specializzate e tempi di rilevazione lunghi. I saggi immunologici, molto utilizzati nella routine di laboratorio, hanno limitazioni come la mancanza di specificità per alcuni antigeni o la bassa presenza di antigeni specifici. Inoltre, i metodi immunologici non sempre correlano direttamente con l'infezione attiva, ad esempio durante la fase finestra di un'infezione o in caso di infezione precedente.

Nel campo della **virologia**, le tecniche molecolari sono state introdotte accanto ai metodi tradizionali per consentire una diagnosi diretta basata sulla rilevazione di specifici acidi nucleici virali. Queste tecniche superano i limiti dei metodi classici, offrono elevata sensibilità e consentono risultati rapidi senza la necessità che il virus si moltiplichi o induca la produzione di anticorpi rilevabili. Sono applicabili a diversi tipi di campioni biologici. ***Tuttavia, le tecniche molecolari presentano anche alcune limitazioni.*** Sono complesse e richiedono personale altamente qualificato, oltre ad essere più costose rispetto ai metodi tradizionali.

Tra le **tecniche molecolari**, l'amplificazione degli acidi nucleici è ampiamente utilizzata nella diagnostica virologica, con la PCR (Polymerase Chain Reaction) come metodo più comune e versatile. La PCR classica e la Real Time PCR sono particolarmente preferite per la loro velocità, sensibilità, specificità e capacità di fornire una diagnosi rapida e mirata. Questi metodi sono di fondamentale importanza per le infezioni virali che coinvolgono il sistema nervoso centrale, come le encefaliti virali, in quanto offrono elevata sensibilità e specificità.

La Real Time PCR è in grado di quantificare la carica virale, fornendo informazioni cruciali per una terapia mirata. Tuttavia, la PCR è un processo aperto che può causare contaminazioni tra campioni e durante la stessa reazione di amplificazione.

Nel caso delle encefaliti virali che coinvolgono il sistema nervoso centrale, è importante identificare la presenza di specifici bersagli virali e quantificare la quantità di virus nel liquido cerebrospinale. La Real Time PCR è necessaria per ottenere dati quantitativi in quanto permette l'amplificazione e la rilevazione simultanee del prodotto amplificato. I marcatori fluorescenti utilizzati durante la reazione di amplificazione consentono una rilevazione precoce e migliorano la sensibilità del metodo. La fase esponenziale della reazione è la fase in cui è possibile ottenere misurazioni accurate prima che l'efficienza della reazione sia influenzata negativamente da altri fattori. I termociclatori sviluppati per la Real Time PCR sono in grado di generare un fascio luminoso per eccitare i marcatori fluorescenti e rilevare la fluorescenza emessa. Questi termociclatori sono collegati a un computer che raccoglie il segnale di fluorescenza durante la reazione e lo rappresenta in un grafico, consentendo il monitoraggio in tempo reale dell'avanzamento della reazione.

La **RILEVAZIONE DELL'AMPLIFICATO** utilizza marcatori fluorescenti, che possono essere coloranti fluorescenti intercalanti nel DNA o sonde oligonucleotidiche fluorescenti. Il metodo più comune utilizza il colorante fluorescente "Sybr Green", che si lega al DNA a doppia elica. Tuttavia, il Sybr Green non aggiunge specificità rispetto ai primer utilizzati e può dare segnali fluorescenti anche in presenza di contaminanti o amplificazioni aspecifiche.

Per aumentare la specificità, si possono utilizzare sonde specifiche in combinazione con la PCR in tempo reale. Le sonde specifiche sono brevi sequenze oligonucleotidiche che riconoscono una sequenza complementare all'interno del DNA amplificato. Esistono diversi tipi di sonde, tra cui il sistema **TaqMan**, che sfrutta l'emissione di fluorescenza durante la polimerizzazione. La sonda TaqMan è costituita da una sequenza oligonucleotidica che riconosce la sequenza complementare e viene coniugata a un reporter che emette fluorescenza e a un quencher che assorbe la fluorescenza.

Durante la fase di estensione, la Taq polimerasi degrada la sonda TaqMan, separando il quencher dal reporter e consentendo l'emissione di fluorescenza. Il segnale fluorescente rilevato durante ogni ciclo di amplificazione è proporzionale alla quantità di amplificato presente. Tuttavia, la sonda TaqMan viene degradata ad ogni ciclo successivo, rendendola "ad esaurimento".

LE SONDE FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) sono due brevi sequenze oligonucleotidiche che si appaiano in posizione adiacente durante la PCR. La prima sonda è coniugata a un fluoroforo donatore che emette fluorescenza a una lunghezza d'onda specifica quando eccitato, mentre la seconda sonda è coniugata a un fluoroforo accettore. Durante l'appaiamento, l'energia di fluorescenza viene trasferita dal donatore all'accettore, che riemette la fluorescenza a una diversa lunghezza d'onda. A differenza delle sonde TaqMan, le sonde FRET emettono segnali fluorescenti ad ogni ciclo di appaiamento e non si esauriscono.

Le sonde chiamate **MOLECULAR BEACONS** sono costituite da una sequenza oligonucleotidica complementare a una regione interna amplificata del primer. Questa sonda ha una struttura a forcina quando è libera in soluzione, con un fluoroforo reporter in 5' e un fluoroforo quencher in 3'. Durante l'appaiamento, la sonda si apre e il reporter si allontana dal quencher, consentendo l'emissione di fluorescenza. Tuttavia, le strutture a forcina dei molecular beacons possono essere stabili, causando difficoltà nell'uso di queste sonde.

Un vantaggio delle sonde sequenza-specifiche è che consentono la multiplex PCR, cioè l'amplificazione di più target contemporaneamente. Durante la PCR in tempo reale, l'intensità del segnale fluorescente emesso viene registrata in funzione del numero di cicli. All'inizio, il segnale è basso perché l'amplificato è ancora in

quantità ridotta, ma aumenta con il progresso della reazione. La linea di base rappresenta il segnale fluorescente minimo, mentre la linea soglia è una soglia prestabilita che interseca la curva di amplificazione di ogni campione nella fase esponenziale. Il ciclo soglia (CT) è il numero di ciclo in cui il segnale del campione supera la linea soglia ed è inversamente proporzionale alla quantità di DNA iniziale. Il delta CT rappresenta la differenza di ciclo soglia tra due campioni e rimane costante indipendentemente dalla concentrazione iniziale di DNA. La determinazione del CT è importante perché fornisce una misura quantitativa dell'acido nucleico presente. I metodi di quantificazione possono variare a seconda dell'obiettivo dell'analisi.

LA QUANTIFICAZIONE RELATIVA è un metodo semplice in cui si utilizza un gene di controllo per normalizzare e determinare la concentrazione dell'acido nucleico nel campione rispetto a un gene di riferimento, chiamato gene housekeeping. I valori di CT del gene endogeno e del DNA del campione vengono calcolati e confrontati con quelli del controllo endogeno. I campioni vengono quindi espressi come un numero di volte maggiore o minore rispetto al controllo, consentendo di valutare le differenze di quantità di DNA tra i campioni.

Nel caso della **QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA**, tipicamente utilizzata in sierologia, si costruisce una curva standard utilizzando campioni di DNA a concentrazioni note crescenti. La curva rappresenta la fluorescenza e il valore di CT in funzione del logaritmo della concentrazione di DNA. Attraverso questa curva, è possibile estrapolare la concentrazione del target nei diversi campioni conoscendo il loro valore di CT, ottenendo così informazioni sulla carica virale o sul numero di copie/ml.

L'ANALISI DELLA CURVA DI DISSOCIAZIONE, o melting, è un vantaggio offerto dalla tecnologia della real-time PCR. Dopo l'amplificazione, si aumenta gradualmente la temperatura all'interno delle reazioni per osservare la dissociazione del DNA e delle sonde legate alla sequenza target. Misurando la variazione di fluorescenza al variare della temperatura, si ottiene una curva di dissociazione in cui si determina la temperatura di melting (T_m), corrispondente al punto in cui le sonde iniziano a distaccarsi. Questa analisi consente di verificare la specificità dei prodotti di amplificazione.

La **TEMPERATURA DI MELTING** rappresenta la temperatura a cui il 50% della sonda si dissocia dal target. Dipende da fattori come la lunghezza, la struttura, la sequenza e il contenuto di G-C della sonda, nonché dalla sua omologia con il target. I diversi prodotti individuati da diverse sonde avranno profili cinetici distinti, il che permette di identificare la presenza di prodotti di diverse dimensioni e valutare l'amplificazione specifica o non specifica.

L'analisi dei profili di melting è particolarmente importante in biologia perché consente di discriminare virus che differiscono per una singola base nucleotidica, come ad esempio l'herpes virus di tipo 1 e 2. Utilizzando sonde specifiche per l'herpes virus di tipo 1, anche in presenza del tipo 2, si osserveranno due diversi picchi nella curva di melting a causa del mismatch, indicando un diverso pattern cinetico di fluorescenza.

La PCR in tempo reale presenta numerosi vantaggi rispetto alla PCR convenzionale:

- a. Maggiore sensibilità grazie all'uso di marcatori fluorescenti.
- b. Maggiore specificità di rilevazione.
- c. Minore rischio di falsi positivi grazie all'uso di sonde specifiche.
- d. Fornisce dati quantitativi.
- e. Tempi di esecuzione ridotti.
- f. Non richiede ulteriori analisi post-PCR.
- g. Minore rischio di contaminazione in quanto tutto avviene in un'unica fase.

Tuttavia, la PCR in tempo reale presenta anche alcuni svantaggi:

- a. Richiede personale altamente specializzato, strumentazione dedicata e standardizzazione.
- b. Nel contesto del laboratorio clinico, richiede un sistema standardizzato che copra tutte le fasi, dall'estrazione degli acidi nucleici ai risultati finali. L'uso di kit commerciali standardizzati è necessario per ottenere risultati riproducibili e di qualità.

La Real Time PCR ha diverse applicazioni nella diagnostica virologica:

1. **Determinazione quantitativa della viremia:** Permette di misurare la quantità di virus nel sangue e fornire informazioni sull'attività virale. Ad esempio, nei casi di epatite B, i livelli di viremia possono aiutare a distinguere tra infezione attiva e inattiva, nonché a valutare lo stadio della malattia.
2. **Identificazione di infezioni virali latenti e rilevazione precoce delle riattivazioni:** La Real Time PCR consente di rilevare la presenza di virus in fase latente o inattiva. Questo è utile per identificare le riattivazioni virali, che possono essere clinicamente silenti ma che potrebbero richiedere un intervento terapeutico tempestivo. Un esempio è l'infezione da citomegalovirus, che può riattivarsi in soggetti immunodepressi o sottoposti a trapianto d'organo.
3. **Razionalizzazione della terapia antivirale e monitoraggio della risposta:** La Real Time PCR aiuta nella scelta della terapia antivirale adeguata e nel monitoraggio della risposta del paziente. Ad esempio, nell'epatite cronica di tipo C, i diversi genotipi del virus richiedono approcci terapeutici diversi. Identificare il genotipo consente di impostare la terapia corretta e di considerare opzioni alternative se necessario.
4. **Identificazione di virus mutanti:** La Real Time PCR consente di rilevare precocemente l'emergere di virus mutanti. Questo è particolarmente importante nell'epatite B, in cui i ceppi virali mutanti possono diventare predominanti durante la terapia con analoghi nucleosidici. Rilevare rapidamente queste mutazioni consente di regolare la terapia di conseguenza.

La Real Time PCR fornisce informazioni dettagliate sulla presenza e l'attività dei virus, consentendo un approccio più mirato nella diagnosi e nel trattamento delle infezioni virali.

MICROARRAY: è un dispositivo avanzato che consente l'analisi simultanea di decine di migliaia di geni, fornendo un profilo genico di espressione per una cellula o un tessuto. Si basa sul principio dell'ibridazione degli acidi nucleici e si differenzia dalle tecniche di Southern e Northern Blotting per due caratteristiche principali:

1. Nei MicroArray, i campioni di acido nucleico da analizzare sono marcati e presenti in forma libera, mentre le sonde sono fissate su un supporto solido. Nelle tecniche di Blotting, gli acidi nucleici vengono fissati su un filtro e successivamente viene applicata una sonda marcata per l'ibridazione.
2. Nei MicroArray, vengono utilizzate centinaia di migliaia di sonde, mentre nelle tecniche di Blotting si utilizzano una o al massimo due o tre sonde.

Un MicroArray è costituito da una matrice di spot, piccole aree circolari su un supporto solido, disposte in un preciso ordine geometrico. Ogni spot rappresenta un gene specifico e contiene migliaia di sonde corrispondenti a quel gene. Durante il processo di ibridazione, i cDNA target marcati riconoscono e si legano alle sonde corrispondenti, generando un segnale fluorescente che indica l'espressione e l'attività di quel gene. Le sonde corrispondono a sequenze specifiche dell'RNA messaggero e l'intensità dell'ibridazione fornisce informazioni sull'attività del gene.

Il MicroArray è un dispositivo tecnologicamente avanzato utilizzato per l'analisi simultanea di numerosi geni, consentendo di ottenere una grande quantità di informazioni sul profilo genico di una cellula o di un tessuto. È un'evoluzione delle tecniche classiche di ibridazione degli acidi nucleici come la Southern e Northern Blotting.

Nel saggio di MicroArray, sono coinvolti due componenti essenziali: l'RNA target, estratto da campioni di controllo e sperimentali, e un chip di MicroArray contenente sonde legate ad esso. Durante il processo sperimentale, l'RNA viene estratto e retrotrascritto in cDNA, che viene successivamente marcato con fluorocromi. I cDNA marcati vengono quindi fatti ibridare con le sonde presenti sul chip.

La creazione di un MicroArray richiede due elementi principali: le sonde e il supporto solido su cui vengono posizionate. Le sonde, specifiche per sequenze genetiche, sono legate al supporto solido in piccole aree circolari chiamate spot, disposte in una matrice di cubi su linee orizzontali e verticali. Ogni spot rappresenta un'unità minima di MicroArray e contiene migliaia di sonde corrispondenti a un gene specifico. Il supporto solido deve essere planare e omogeneo, preferibilmente di vetro, per garantire un'uguale densità di sonda in ogni spot.

Durante l'ibridazione, i cDNA marcati riconoscono le sonde complementari presenti sul chip e si legano ad esse, generando un segnale fluorescente che indica l'espressione e l'attività del gene corrispondente. Le sonde devono essere specifiche e univoche per garantire la corretta identificazione di un determinato gene. L'identificazione delle sonde all'interno del trascrittoma (l'insieme dei trascritti presenti in una cellula o un tessuto) richiede l'uso di database e software dedicati per individuare sequenze uniche espresse o EST (expressed sequence tag).

Negli esperimenti di MicroArray, l'uso di supporti impermeabili come il vetro ha superato i problemi associati ai supporti porosi utilizzati in passato. I supporti impermeabili consentono l'utilizzo di minori volumi di campione, una reazione di ibridazione più rapida e un ridotto background di autofluorescenza, garantendo una maggiore precisione e standardizzazione del metodo.

Gli **SPOTTED ARRAY** sono la prima tecnologia sviluppata per l'analisi genetica e consistono in array in cui le sonde, pre-sintetizzate in vitro, vengono depositate in modo ordinato e riproducibile su un vetrino mediante sistemi robotici. Le sonde hanno una lunghezza ottimale compresa tra 300 e 800 paia di basi, anche se in alcuni casi le sequenze possono essere più lunghe. Tuttavia, sonde troppo lunghe possono causare problemi di discriminazione tra geni diversi e di identificazione di varianti di splicing all'interno di uno stesso gene a causa di possibili reazioni di ibridazione incrociata. Per superare questi problemi, sono stati introdotti gli "long oligonucleotide array", in cui vengono utilizzate sequenze oligonucleotidiche più corte (tra 50 e 80 paia di basi) selezionate da regioni codificanti del gene.

Gli spotted array consentono di valutare contemporaneamente il profilo di espressione genica su due campioni, uno dei quali funge da controllo. Gli RNA isolati dai campioni vengono retrotrascritti in cDNA e marcati con fluorocromi, di solito le cianine. La cianina 3, che emette luce verde, viene associata al campione di controllo, mentre la cianina 5, che emette luce rossa, viene associata al campione sperimentale.

I cDNA marcati vengono poi mescolati e ibridati su un unico chip, in una reazione competitiva in cui il DNA presente nel campione di controllo e nel campione sperimentale competono per il legame con le sonde presenti sul chip. L'intensità del legame indica il livello di espressione del gene corrispondente. Per evitare problemi derivanti dalle dimensioni e dalla labilità dei fluorocromi, viene effettuato uno "scambio di colori" in cui il campione di controllo viene marcato con la cianina 5 e quello sperimentale con la cianina 3. I risultati ottenuti vengono quindi comparati per garantire che le differenze non siano dovute alla marcatura.

Dopo l'ibridazione, il vetrino viene scansionato utilizzando due fasci di luce laser a diverse lunghezze d'onda, che eccitano i fluorocromi e rilevano la fluorescenza emessa in due canali separati. Le immagini ottenute vengono memorizzate e rielaborate mediante un software dedicato, che calcola il rapporto tra l'intensità dei due fluorocromi e restituisce un'unica immagine dell'array. Ogni spot nell'immagine corrisponde a uno spot dell'array e viene colorato in modo pseudocromatico per indicare il livello di espressione del gene nel campione in analisi rispetto al controllo. Ad esempio, un'indicazione di colore rosso indica un'alta espressione nel campione in analisi, mentre un colore verde indica una bassa espressione. Il colore giallo indica un'uguale espressione nei due campioni.

In sintesi, gli spotted array sono una tecnologia che permette di valutare contemporaneamente il profilo di espressione genica su due campioni, utilizzando sonde depositate su un vetrino. Attraverso l'uso di fluorocromi e la scansione del vetrino, è possibile ottenere informazioni sul livello di espressione dei geni e confrontare i risultati tra i campioni di controllo e sperimentali.

L'analisi dei dati inizia con la normalizzazione, che mira a ridurre la variabilità dovuta all'operatore o alle diverse condizioni sperimentali. Si normalizzano i risultati rispetto a un riferimento quantitativo comune, che può essere un mRNA di riferimento non espresso nel campione in analisi. Una volta normalizzati, i dati vengono analizzati a diversi livelli.

Il **primo** livello consiste nel calcolare la significatività statistica dei dati.

Il **secondo** livello permette la classificazione dei geni in gruppi (clustering) al fine di evidenziare relazioni tra di essi. Questa analisi viene eseguita su tutti i geni rappresentati nell'array mediante clustering gerarchico.

Nei gruppi di geni vengono identificati quelli con livelli di espressione simili, che sono attivati o inibiti contemporaneamente, permettendo di individuare interazioni tra geni. Il clustering gerarchico è il metodo più utilizzato, costruendo un dendrogramma che rappresenta un albero genealogico in cui i geni con espressioni simili vengono raggruppati insieme. Ciò consente una lettura immediata dei risultati, poiché utilizzando la cianina rossa per il campione in analisi e la cianina verde per il controllo, è possibile individuare i geni iperespressi o ipoespressi nel campione stesso. Il colore rosso indica l'iperespressione, mentre il verde indica l'ipoespressione.

Il terzo livello consente di passare alla genomica funzionale, individuando le interazioni funzionali tra i diversi gruppi di geni. Questo avviene attraverso l'utilizzo di database che analizzano se i geni sono stati correlati in altri studi. Questi sistemi, come il NetAffx Analysis Center, identificano i geni differenzialmente espressi e li confrontano con altre banche dati, arricchendo l'esperimento con informazioni provenienti da altre parti del mondo. Inoltre, GenMapp consente l'identificazione di pathway metabolici, di trasduzione e biosintetici.

In conclusione, l'analisi dei dati comprende la normalizzazione, il calcolo della significatività statistica, il clustering gerarchico per la classificazione dei geni e l'identificazione delle interazioni funzionali attraverso l'utilizzo di database e software specifici.

Le applicazioni dei microarrays hanno subito diverse evoluzioni sia dal punto di vista tecnologico che da quello applicativo. Le due principali applicazioni sono l'analisi dei profili di espressione genica su larga scala, che consente la classificazione delle patologie e l'identificazione di marcatori diagnostici, e l'analisi delle variazioni di sequenza del DNA, inclusi mutazioni e polimorfismi.

Oggi, i microarrays vengono utilizzati in diverse aree:

1. CGH-arrays (Comparative Genomic Hybridization arrays), per individuare rapidamente delezioni o mutazioni geniche di grandi dimensioni.
2. ChIP-on-Chip (Chromatin Immunoprecipitation), che consente l'identificazione dei siti di legame dei fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione genica.
3. Methylation arrays, per rilevare rapidamente variazioni nella metilazione del DNA.
4. Arrays di proteine, che consentono l'identificazione di proteine nel siero di un paziente in risposta a un trattamento o per scopi di identificazione proteica.
5. Arrays di anticorpi.
6. Arrays di tessuti.

L'ampio utilizzo di questa tecnologia è dovuto alla sua versatilità, rapidità e riproducibilità. È possibile identificare rapidamente variazioni del DNA e utilizzare una vasta gamma di analisi. Quasi tutto il processo è automatizzato per mantenere la minima possibilità di variabilità, ad esempio nella fase di prelievo e isolamento dei campioni. Grazie a queste caratteristiche, gli arrays hanno contribuito notevolmente alla ricerca traslazionale, ovvero al trasferimento delle informazioni ottenute dalla ricerca di base alla pratica clinica.

Nell'oncologia, gli arrays hanno aiutato nell'identificazione delle classi tumorali molecolari. In microbiologia, sono stati utilizzati per identificare rapidamente patogeni infettanti e studiare la sottocolonizzazione. In genetica, sono stati impiegati per l'analisi delle resistenze antibiotiche. Nella farmacogenetica, gli arrays sono stati utilizzati per valutare la tossicità dei farmaci e la resistenza genetica ad essi. Gli arrays in oncologia sono utilizzati per identificare marcatori che possono fornire informazioni sul decorso della malattia e sulla risposta del paziente alla terapia. Ciò è particolarmente importante poiché i tumori, nonostante abbiano un'origine simile, presentano differenze molecolari che influenzano il loro sviluppo, progressione e risposta al trattamento. Le tecniche tradizionali come l'istochimica o la PCR di base non sono in grado di rilevare queste differenze molecolari. Nel campo del **carcinoma mammario**, gli arrays hanno cambiato l'approccio diagnostico consentendo l'identificazione di nuove classi tumorali molecolari. Studi significativi hanno associato i tumori mammari alla distinzione classica ER+ ed ER- (tumori che esprimono o non esprimono il recettore degli estrogeni), che definisce la scelta terapeutica. Tuttavia, ulteriori studi hanno dimostrato che esistono sottoclassi di tumori ER+ per cui la terapia endocrina potrebbe non essere sufficiente.

Uno studio condotto su tumori mammari primari ha identificato un profilo di espressione genica correlato all'aggressività della malattia. L'analisi di 70 geni ha permesso di identificare due gruppi di pazienti: uno con un profilo prognostico favorevole che non sviluppava metastasi nei cinque anni successivi, e un altro con un profilo prognostico sfavorevole. Questo studio è stato successivamente ampliato su un numero maggiore di pazienti, dimostrando che l'analisi di questi 70 geni consente una migliore stratificazione dei pazienti, identificando con precisione quelli a basso o alto rischio di sviluppare metastasi. Questa analisi è stata commercializzata come "mamma-print" ed è ora utilizzata in alcuni istituti per pazienti con una storia di carcinoma mammario.

Questi studi hanno dimostrato come le nuove tecniche genomiche, affiancate alle tradizionali analisi istomorfologiche, possano individuare nuove classi diagnostiche non solo nel carcinoma mammario, ma anche in altri tipi di tumori.

La **medicina traslazionale** utilizza tecniche di laboratorio per collegare la ricerca medica alla pratica clinica, al fine di affrontare patologie complesse. Le malattie genetiche, le patologie cronico-degenerative e le patologie acute sono alcune delle aree che richiedono l'applicazione della medicina traslazionale.

Il processo di **ricerca scientifica** coinvolge la selezione di un quesito e la formulazione di un'ipotesi, la verifica dell'ipotesi, l'interpretazione dei risultati e la valutazione oggettiva e riproducibile dei risultati. Medici, laboratoristi e ricercatori svolgono queste attività al fine di ottenere risultati applicabili nella medicina clinica, che sono fondamentali per la prevenzione delle malattie, la diagnosi precoce e i trattamenti terapeutici e farmacologici.

La ricerca scientifica può essere di diversi tipi: **ricerca di base** per identificare meccanismi molecolari e nuovi bersagli molecolari, ricerca preclinica per valutare l'efficacia di nuovi farmaci e strumenti diagnostici, **ricerca clinica** per verificare l'efficacia di nuovi farmaci e strumenti sui pazienti, **ricerca epidemiologica** per studiare la distribuzione di una malattia e i fattori di rischio nella popolazione, e **ricerca traslazionale** che unisce la ricerca di laboratorio all'applicazione medica per ridurre l'incidenza e la mortalità delle malattie.

Nel pianificare un esperimento, è importante che l'ipotesi sia scientificamente rilevante, metodologicamente corretta ed eticamente accettabile. La valutazione del progetto da parte di un Comitato Etico è necessaria sia per gli studi su animali che per quelli su pazienti umani. È inoltre importante acquisire una conoscenza approfondita della storia e del background dello studio attraverso la revisione della letteratura scientifica. Successivamente, si pianifica e verifica il disegno sperimentale, si analizzano i risultati in modo matematico o grafico e si valuta la loro significatività statistica. Infine, vengono comunicate le conclusioni e le osservazioni finali.

Il razionale di un lavoro scientifico comporta l'identificazione di un'ipotesi sperimentale da verificare o confutare attraverso prove sperimentali, e deve includere un'informazione mancante nella letteratura scientifica.

Attualmente, sono in corso ricerche sugli acidi grassi polinsaturi omega-3, i quali sembrano essere convertiti in derivati etanolamminici all'interno delle cellule tumorali mammarie. Tuttavia, l'attività biologica di tali derivati è ancora sconosciuta. Pertanto, il razionale del lavoro si basa sulla valutazione degli effetti di questi derivati sulle linee cellulari mammarie al fine di comprendere la loro attività biologica. Se il lavoro è considerato valido, viene pubblicato in importanti banche dati come PubMed, facilitando la ricerca attraverso parole chiave. Per verificare l'introduzione di questa ipotesi, può essere utilizzato il ClinicalTrials.gov, un registro degli studi di medicina clinica.

Gli omega-3 sono acidi grassi essenziali che si distinguono per la posizione del primo doppio legame, che si trova al terzo carbonio a partire dalla fine della catena (carbonio ω o carbonio n). Sono noti per la loro presenza nelle membrane cellulari e il mantenimento della loro integrità, e talvolta sono inclusi nella categoria delle vitamine F. Sono presenti principalmente nel pesce (EPA e DHA), nell'olio di pesce (EPA e DHA) e nei crostacei (EPA e DHA). I due omega-3 più importanti sono l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), entrambi polinsaturi e caratterizzati dalla presenza di doppi legami nella loro struttura. Si è osservato che EPA e DHA possono essere trasformati in derivati dell'etanolamina, come

EPEA e DHEA. Questi derivati inducono la morte delle cellule tumorali del carcinoma mammario dipendente dagli estrogeni attraverso l'autofagia. In particolare, attivano il recettore nucleare PPAR-gamma (recettore attivato dal proliferatore dei perossisomi gamma) presente nel citoplasma, che, in presenza di un ligando, si sposta nel nucleo e attiva la trascrizione di geni bersaglio, promuovendo la proliferazione di nuove proteine. Al momento, tuttavia, non sono disponibili studi clinici su questo tema.

Il recettore PPAR-gamma è coinvolto anche nell'omeostasi metabolica, soprattutto nel metabolismo glucidico e lipidico. Un farmaco utilizzato nel trattamento del diabete di tipo 2, chiamato tiazolidindione, agisce come ligando del recettore PPAR-gamma e migliora la sensibilità insulinica attivando una serie di pathway. Pertanto, lo studio sugli omega-3 potrebbe fornire un razionale valido per migliorare l'efficacia farmacologica nel trattamento del tumore mammario.

Successivamente, si procede alla selezione del tipo cellulare in base al target biologico desiderato e al saggio biologico da utilizzare. Le linee cellulari tumorali mammarie sono classificate in base all'espressione dei recettori estrogenici (ER), del recettore del progesterone (PR) e del recettore 2 per il fattore di crescita epiteliale (HER2). In laboratorio, si crea un ambiente favorevole alle cellule neoplastiche, riproducendo il tessuto cellulare e aggiungendo fattori specifici. Ad esempio, la linea cellulare MCF7 esprime i recettori per gli estrogeni e il progesterone, quindi rappresenta un tumore estrogeno-dipendente. Al contrario, altre cellule come le MDA-MB-231 sono più aggressive in quanto non esprimono nessuno dei tre recettori, caratterizzando un tumore triplo negativo in cui non sono presenti target farmacologici per il trattamento del carcinoma mammario.

Pertanto, l'obiettivo è valutare se i derivati degli omega-3 possano modificare il fenotipo delle cellule tumorali mammarie, analizzando l'effetto citologico sulla vitalità e la proliferazione cellulare, la capacità di modulare la motilità cellulare e il potere invasivo.

È importante ricordare che quando non esistono cure specifiche, viene spesso utilizzata la chemioterapia, che agisce su tutto l'organismo, colpendo non solo le cellule tumorali ma anche altri target non specifici, portando a prognosi sfavorevoli.

La citotossicità si riferisce all'effetto di sostanze chimiche, fisiche o biologiche che causano danni alle cellule. I saggi di citotossicità valutano l'effetto di tali sostanze e possono essere divisi in saggi di vitalità cellulare e saggi di proliferazione cellulare. I saggi di vitalità cellulare misurano l'attività enzimatica e l'integrità della membrana cellulare, utilizzando metodi come il Trypan Blue e l'MTT assay. Il Trypan Blue colora le cellule morte, mentre l'MTT assay misura la quantità di formazano prodotto dalle cellule vive. I dati ottenuti dai saggi vengono elaborati matematicamente e graficamente, utilizzando analisi statistiche per valutare la significatività dei risultati.

Nel saggio della timidina triziata, un isotopo radioattivo viene incorporato nel DNA delle cellule durante la sintesi del DNA, mentre nel saggio del soft agar si valuta la capacità delle cellule tumorali di formare colonie in un ambiente non ancorato. Entrambi i saggi forniscono informazioni sull'aggressività tumorale.

Un esperimento condotto su cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231 ha dimostrato che il DHEA e l'EPEA riducono la proliferazione delle cellule tumorali. È importante condurre studi anche su cellule non tumorali per valutare gli effetti collaterali delle sostanze testate. Inoltre, è stato osservato che il DHEA inibisce il reclutamento dei macrofagi e la trasformazione in macrofagi associati al tumore (TAM), riducendo la vitalità cellulare e la motilità cellulare. Il DHEA influisce anche sulla produzione di citochine da parte dei macrofagi e delle cellule tumorali, contribuendo alla repressione del carcinoma mammario.

Ricorda: *il 30% dei tumori umani, tra cui il tumore mammario e prostatico, può essere causato da fattori legati alla dieta.*

MICROSCOPIA A FLUORESCENZA: utilizza anticorpi legati a fluorocromi per evidenziare specifiche componenti all'interno di un campione istologico o cellulare. È ampiamente utilizzata nel campo biomedico per visualizzare componenti cellulari, studiare la localizzazione di sostanze farmacologiche o agenti antinfestanti, identificare la presenza simultanea di più componenti proteiche nello stesso posto e momento,

nonché studiare la dinamica delle proteine all'interno delle cellule. La microscopia a fluorescenza consente anche di descrivere processi come la diffusione molecolare tra i compartimenti cellulari, le variazioni di pH e le reazioni enzimatiche specifiche.

Tuttavia, il microscopio ottico ha un limite di risoluzione di circa 200 nm, al di sopra del quale i punti si sovrappongono e non possono essere distinti come singoli oggetti. I microscopi elettronici, come quelli a scansione e a trasmissione, offrono un potere di risoluzione maggiore, consentendo ingrandimenti fino a 100.000 volte. Tuttavia, anche con tali microscopi, esistono limiti nella capacità di visualizzare particelle molto piccole all'interno delle cellule, che possono essere superati utilizzando fluorocromi.

I fluorocromi sono molecole eccitate da un fascio di luce, di solito un laser. Dopo l'eccitazione, la molecola emette un fascio di luce a una diversa lunghezza d'onda, che può essere utilizzata per ottenere diverse colorazioni.

ESEMPIO: Il FITC è un fluorocromo ampiamente utilizzato nella microscopia a fluorescenza. Quando l'anticorpo viene coniugato al FITC o ad altri fluorocromi, si sceglie il fluorocromo più appropriato per il target di ricerca. L'uso di più fluorocromi consente di indagare diverse componenti all'interno di una cellula, distinguendo colorazioni diverse.

È importante che il fluorocromo non interferisca con gli epitopi riconosciuti dall'anticorpo primario, altrimenti si potrebbe impedire il legame. Quando si coniuga il fluorocromo all'anticorpo, devono essere mantenute le caratteristiche dell'anticorpo stesso, come la specificità, la sensibilità, la risoluzione e la riproducibilità.

Invece di utilizzare un anticorpo primario già coniugato al fluorocromo, si preferisce utilizzare un anticorpo secondario meno costoso. L'anticorpo secondario si lega all'anticorpo primario e può essere coniugato a un diverso fluorocromo, consentendo di ottenere diverse colorazioni per diverse componenti cellulari.

Nell'immagine microscopica, è possibile identificare le diverse componenti colorate in modo diverso utilizzando fluorocromi che emettono luce di diverse lunghezze d'onda, come verde, rosso, giallo, ecc.

È importante includere controlli positivi e negativi in ogni esperimento per verificare l'accuratezza della reazione e l'interpretazione corretta dei risultati. I controlli positivi sono campioni che esprimono sicuramente l'antigene di interesse per testare la specificità dell'anticorpo, mentre i controlli negativi includono campioni privi dell'antigene o l'omissione dell'anticorpo primario per valutare la specificità dell'anticorpo secondario.

Quando si utilizzano fluorocromi, è importante che non alterino le proprietà delle proteine a cui si legano e che presentino specificità adeguata. Inoltre, non devono causare denaturazione, precipitazione o perdita di capacità di legame con altre componenti funzionali o strutturali del campione. Devono anche essere poco tossici e non presentare attività biologica significativa per consentirne l'uso su campioni in vivo.

L'AUTOFLUORESCENZA rappresenta una sfida nella preparazione di campioni per l'analisi in microscopia a fluorescenza. Questo fenomeno si verifica quando i componenti cellulari emettono spontaneamente luce quando eccitati. In alcuni casi, il campione può essere visualizzato senza l'uso di anticorpi primari o secondari.

La fissazione del campione sul vetrino è fondamentale per evitare la perdita del materiale biologico. I fissativi comunemente utilizzati, come la formaldeide e la paraformaldeide, possono generare molecole fluorescenti. L'intensità del segnale fluorescente dipende sia dalla quantità di fluorocromo utilizzato che dalla quantità di proteina di interesse presente nel campione.

È importante conoscere il coefficiente di estinzione molare, che rappresenta la probabilità che una mole di fluorocromo assorba il fascio di luce incidente. Il fluorocromo deve essere eccitabile per emettere fluorescenza, quindi è necessario assicurarsi che tutti i fluorocromi utilizzati siano efficacemente eccitabili.

Inoltre, l'efficienza quantica, che misura l'efficienza di conversione della luce in fluorescenza, influisce sull'intensità del segnale luminoso.

La fluorescenza ha un periodo di decadimento, il segnale si affievolisce nel tempo. La luce induce cambiamenti nello stato energetico del fluorocromo e i preparati vengono conservati al buio per evitare il decadimento. Il **FOTODECADIMENTO** è anche influenzato dalla caratteristica intrinseca del fluorocromo stesso. Il quenching è un fenomeno in cui un componente, chiamato reporter, con il fluorocromo emette fluorescenza, ma viene assorbito da un'altra componente chiamata quencher. Quando il reporter e il quencher si legano a una molecola, l'idrolisi provoca la separazione del quencher, consentendo al reporter di emettere fluorescenza. Il fotodecadimento può essere evitato utilizzando antiossidanti, ma ciò non è possibile per i campioni vivi.

LA MICROSCOPIA CONFOCALE: utilizza una configurazione ottica che consente di illuminare solo il piano focale in osservazione e raccogliere la luce solo da quel piano. Utilizzando diversi fluorocromi con lo stesso fascio di eccitazione, è possibile distinguere i colori per osservare diverse proteine contemporaneamente. È importante minimizzare l'esposizione del preparato alla luce per evitare la diminuzione del segnale dovuto al consumo di molecole di fluorocromo. La microscopia confocale può utilizzare filtri per selezionare i fasci luminosi con una specifica lunghezza d'onda.

La microscopia confocale consente l'osservazione tridimensionale e fornisce informazioni più accurate sulla composizione cellulare. Tuttavia, ci sono limitazioni come la sfocatura dell'immagine a causa di piani focali diversi e la difficoltà di mettere a fuoco tutto il preparato. L'apertura chiamata "pinhole" nel microscopio confocale consente di selezionare un fascio di luce specifico e ottenere un'immagine più nitida.

IL PINHOLE (foro stenoscopico) è un diaframma posizionato lungo l'asse ottico di una lente nel punto focale. Nella microscopia confocale, i pinhole di illuminazione e rivelazione sono confocali e permettono di ottenere immagini purificate dalle componenti fuori fuoco e con un aumento della risoluzione massima. Solo la luce proveniente dal piano focale passa attraverso il pinhole, evitando interferenze dalla luce proveniente dal resto dell'oggetto. Questo crea un'immagine ad alto contrasto.

Il **microscopio CLSM** (Confoal Laser Scanning Microscopy) utilizza una lampada a luce visibile standard per localizzare i campioni in campo chiaro o contrasto di fase. Una lampada a vapori di mercurio viene impiegata per individuare le aree di interesse da sottoporre a scansione in condizioni confocali. Viene utilizzato un laser, come l'Argon-Krypton, che permette il montaggio di più sorgenti laser contemporaneamente. La scansione, ottenuta mediante specchi mobili, muove il fascio laser sul campione, consentendo la costruzione digitale dell'immagine. I laser offrono maggiore coerenza spaziale e intensità rispetto alle lampade ad arco, ma hanno un costo superiore.

Le **lampade ad arco** hanno un ampio spettro di emissione ma presentano una bassa coerenza spaziale, limitando la costruzione tridimensionale dell'immagine. Tuttavia, hanno costi di gestione inferiori rispetto ai laser.

LA SCANSIONE è utilizzata per acquisire immagini tridimensionali analizzando il campione in diversi piani, sia longitudinalmente che trasversalmente. Ci sono tre tipi di scansioni: il movimento del campione, il movimento di un singolo fascio di illuminazione e la generazione di fasci di illuminazione multipli. Variando il piano di messa a fuoco del campione, è possibile acquisire più sezioni ottiche successive e ottenere un'immagine tridimensionale. Questo permette di visualizzare chiaramente l'interno della cellula e di ricostruire la sua struttura tridimensionale. **L'acquisizione dell'immagine** può essere effettuata in tre modi: acquisizione **simultanea**, acquisizione per **immagini** e acquisizione per **linee**. Nella modalità di acquisizione simultanea si utilizzano due diverse lunghezze d'onda, ma possono verificarsi interferenze tra i segnali. Nella modalità per immagini si analizza un piano alla volta utilizzando una sola lunghezza d'onda alla volta, mentre nella modalità per linee è possibile accendere e spegnere determinate lunghezze d'onda durante la scansione del fascio.

Una delle applicazioni della tecnica di Förster Resonance Energy Transfer (FRET) è **lo studio delle interazioni proteiche e dei cambiamenti di conformazione delle proteine di membrana**. La FRET si basa

su un donatore e un accettore, e viene utilizzata per rilevare l'emissione di fluorescenza e valutare la vicinanza tra le molecole. L'emissione di un fluorocromo viene captata solo se viene accettata da un'altro fluorocromo vicino, permettendo di visualizzare l'interazione tra le proteine o i cambiamenti conformazionali all'interno di una macromolecola.

In sintesi, la scansione permette l'acquisizione di immagini tridimensionali del campione, mentre la FRET è utilizzata per studiare interazioni proteiche e cambiamenti conformazionali utilizzando donatori e accettori di energia.

La **preparazione dei campioni** per la microscopia a fluorescenza richiede diverse fasi. Ad esempio, per le cellule in coltura, il punto saliente è la fissazione del campione per preservare la struttura e la composizione delle proteine. Questo può essere fatto utilizzando paraformaldeide, etanolo a freddo o acetone. La fissazione è essenziale per evitare la degradazione e la perdita delle proteine durante le fasi successive di preparazione e analisi.

Dopo la fissazione, è necessario permeabilizzare il campione per consentire all'anticorpo primario di entrare nelle cellule e rilevare le proteine. L'agente comunemente utilizzato per la permeabilizzazione è il Triton X-100. Successivamente, si aggiunge l'anticorpo primario, che può essere coniugato con un fluorocromo o non coniugato, dando luogo rispettivamente all'immunofluorescenza diretta o all'immunofluorescenza indiretta. È anche possibile utilizzare un anticorpo secondario con un marcatore fluorescente specifico per l'anticorpo primario.

Dopo la fase di bloccaggio per saturare i siti di legame non specifici, si può procedere con l'analisi. Il montaggio del preparato consente l'osservazione al microscopio a fluorescenza. Se si osservano fluorescenze anomale, è possibile determinarne la provenienza.

La tecnologia Array utilizza i **microRNA (miRNA)**, che sono sequenze di RNA non codificanti di circa 20 nucleotidi. I miRNA sono distinti dai long non coding RNA, che sono trascritti più lunghi e non codificano per mRNA, rRNA e tRNA. Sia i miRNA che i long non coding RNA svolgono un ruolo importante nei processi fisiologici e la loro disregolazione è associata a malattie.

I **miRNA** sono fondamentali per la regolazione dell'espressione genica, in quanto sopprimono l'espressione dei geni bersaglio legandosi alle regioni 3' non tradotte dell'RNA messaggero. Ciò può portare a un'alterazione che impedisce la traduzione dell'RNA messaggero in proteina o alla sua degradazione, a seconda del tipo di appaiamento tra il miRNA e l'RNA messaggero.

Attualmente, sono noti più di 2000 miRNA, e la loro percentuale nel genoma è simile ad altre grandi famiglie geniche regolatorie. Circa il 50% dei miRNA si trova all'interno di geni, mentre l'altro 50% è costituito da unità trascrizionali indipendenti. Tra quelli intragenici, il 40% si trova in introni di geni che codificano per proteine, mentre il restante 10% si trova in introni di trascritti non codificanti per proteine.

La **biogenesi dei miRNA** avviene attraverso una serie di processi di trascrizione e taglio che generano prima un pri-miRNA e successivamente un pre-miRNA. Il pre-miRNA viene poi processato nel citoplasma per formare il miRNA maturo, che può svolgere la sua funzione di regolazione genica cercando il suo bersaglio specifico.

I **siti di legame bersaglio** per i miRNA possono essere canonici o atipici. I siti canonici includono il 7mer-A1 e il 7mer-m8. Nel 7mer-A1, la presenza di una adenina in posizione 1 e una complementarità perfetta nei nucleotidi dal secondo al settimo è essenziale. Nel 7mer-m8, l'adenina in posizione 1 non è necessaria, ma la complementarità in posizione 8 è importante. Altri siti atipici possono avere una buona efficienza a condizione che si mantenga la complementarità ottimale a valle.

I miRNA possono inattivare o attivare l'espressione genica bersaglio. Sono noti molti miRNA con sequenze uniche, e il prefisso del loro nome dipende dalla specie. Le sequenze possono variare leggermente tra gli organismi, ma la conservazione della sequenza indica un ruolo importante nella cellula. Alcuni miRNA possono essere prodotti da loci diversi o possono differire di uno o due nucleotidi nella stessa cellula.

Durante la biogenesi, i miRNA si formano come un doppio filamento che si divide per generare un filamento funzionale. Il suffisso 5p o 3p viene utilizzato per indicare la presenza della sequenza sul braccio 5' o 3'. I miRNA non sono limitati alle cellule, ma sono presenti anche nei fluidi biologici e vengono trasportati nel torrente circolatorio tramite un sistema di esportine. Una volta rilasciati, i miRNA possono influenzare il microambiente circostante, ad esempio nei processi di metastatizzazione nel contesto oncologico.

I miRNA possono essere incorporati in vescicole per evitare la degradazione e successivamente vengono riconosciuti da sistemi di riconoscimento, che sono oggetto di studio per la comprensione dei meccanismi di metastasi. Le lipoproteine ad alta densità (HDL), coinvolte nel trasporto del colesterolo, sembrano essere un veicolo efficace per i miRNA. I miRNA sono stati anche trovati nel liquido seminale e nel latte materno. Considerando che i miRNA regolano l'espressione genica, possono essere utilizzati come biomarcatori. Studi precedenti hanno correlato l'espressione dei miRNA a condizioni come il diabete o la resistenza insulinica, che possono contribuire allo sviluppo del diabete.

La regolazione genica dei miRNA può influenzare l'espressione di diversi geni. Quando si studia l'espressione dei miRNA in una cellula, sia normale che patologica, è possibile trovare geni regolati al rialzo o al ribasso a seconda del contesto. Allo stesso modo, un singolo miRNA può essere regolato al ribasso o al rialzo a seconda del contesto e della patologia. Ad esempio, nel tumore naso-faringeo il miRNA è regolato al ribasso, mentre nel tumore mammario è regolato al rialzo, influenzando geni diversi.

La presenza di determinati miRNA può inibire la trasformazione neoplastica o promuovere la crescita tumorale, a seconda del contesto. Ad esempio, nel tumore naso-faringeo, se il miRNA è regolato al ribasso, può perdere la sua funzione di inibizione della trasformazione neoplastica e può invece influenzare geni come cicline o fattori di crescita. Nel tumore mammario e prostatico, invece, i miRNA possono essere regolati al rialzo, inibendo l'espressione di geni che sopprimono la crescita tumorale.

La curcumina, ad esempio, può aumentare l'espressione dei miRNA in una cellula epatica affetta da steatosi. È possibile utilizzare la PCR in tempo reale per valutare l'espressione genica e identificare i geni coinvolti in determinate patologie.

Per studiare l'espressione dei miRNA, è necessario effettuare ricerche in **silico** e consultare la letteratura scientifica relativa a condizioni come **steatosi, obesità e miRNA**. Successivamente, si possono utilizzare tecniche come la PCR in tempo reale con sonde Taqman per rilevare la quantità di miRNA complementare presente nel campione. È importante ripetere la PCR in tempo reale per confermare le alterazioni dell'espressione.

Successivamente, si può consultare un database per identificare i possibili geni bersaglio dei miRNA. Si possono quindi condurre saggi in vitro per testare l'interazione tra il miRNA e il gene target, utilizzando un sistema di rilevamento come la bioluminescenza per valutare la presenza e l'intensità del segnale. L'analisi della banda può anche fornire informazioni sulla degradazione del gene target. Altre tecniche utilizzate per studiare l'espressione genica includono il microarray e il sequenziamento profondo.

È possibile incontrare la dicitura **"isomiRNA"**, che indica varianti funzionali del miRNA generate da potenziali sequenze simili. È possibile analizzare non solo la forma matura del miRNA, ma anche la forma "non matura" utilizzando specifici primer per rilevare mutazioni in una particolare cellula.

Gli strumenti di previsione del target dei microRNA includono software e database online. Un software utile permette di inserire i microRNA e identifica i geni coinvolti nel metabolismo, nelle alterazioni della struttura cellulare o nella litogenesi. Alcuni strumenti e database comuni sono miRDB, che fornisce previsioni del target miRNA e annotazioni funzionali, e TargetScan, che identifica gli obiettivi regolatori dei microRNA vertebrati.

Per l'analisi dei dati dei microRNA, ci sono strumenti come **miRBase**, che è un database di sequenze e annotazioni di miRNA pubblicate, e **miRCancer**, che raccoglie profili di espressione di microRNA in vari tumori umani. Per il sequenziamento profondo dei microRNA, uno strumento popolare è miRDeep2, che analizza gli RNA sequenziati per scoprire i geni dei microRNA.

Per l'analisi dei dati dei microRNA, ci sono strumenti come **ClustVis**, che consente di creare grafici di analisi dei componenti principali (PCA) e mappe di calore, e **Venny**, che permette di confrontare liste utilizzando i diagrammi di Venn.

La **TaqMan** Array è un metodo ampiamente utilizzato che consente di rilevare 384 diverse sequenze complementari dei microRNA. Questo metodo è utile per individuare anche i microRNA che agiscono come housekeeping, ovvero quelli che non vengono influenzati dal trattamento. È importante includere housekeeping come l'actina o la proteina 18S per garantire il corretto funzionamento cellulare.

Nel processo di spottaggio dei diversi microRNA nei pozzetti, vengono utilizzati 8 punti e si mette la stessa quantità di campione in ogni pozzetto. La piastra viene preparata e sigillata, e l'analisi viene eseguita utilizzando strumenti come il QuantStudio 4-5. I dati vengono letti dal software e possono essere analizzati per ottenere i tempi di uscita e altre informazioni rilevanti.

Il software **System 1**, fornito dalla **ThermoFisher**, viene utilizzato per l'analisi dei risultati ottenuti con le piastre Taqman Array, che comprendono 384 sequenze. È una scelta comune perché è gratuito e offre funzionalità di generazione di grafici. Per utilizzare il software, i dati possono essere inseriti direttamente dallo strumento o in formato txt, inclusi i dati di uscita dalla corsa di PCR e i dati della piastra.

Il processo di analisi prevede la selezione dei dati e diverse opzioni, come il numero di cicli, solitamente impostato a 40. È necessario selezionare un controllo endogeno, che rappresenta un gene non influenzato dal trattamento. Ci sono diverse opzioni di controllo endogeno tra cui scegliere, ma è importante trovare un gene che non sia né troppo vicino né troppo lontano dai tempi di uscita del gene in esame. Non esiste un housekeeping ideale per tutti i geni, quindi è necessario fare una scelta in base all'espressione genica.

Il software fornisce una serie di informazioni, come i **valori CT** dei controlli candidati e selezionati per tutti i campioni, nonché un punteggio calcolato. È possibile selezionare uno o più controlli per la normalizzazione dei dati, utilizzando il valore medio di CT dei controlli selezionati. Il punteggio è calcolato in base ad altri controlli e sarà lo stesso se si utilizzano solo due controlli, ma sono necessari almeno due controlli per calcolarlo.

L'obiettivo dell'analisi è individuare i punti focali per identificare la terapia adeguata, e i dati possono essere visualizzati in diversi formati, incluso il confronto tra l'espressione dei geni e la generazione di grafici.