

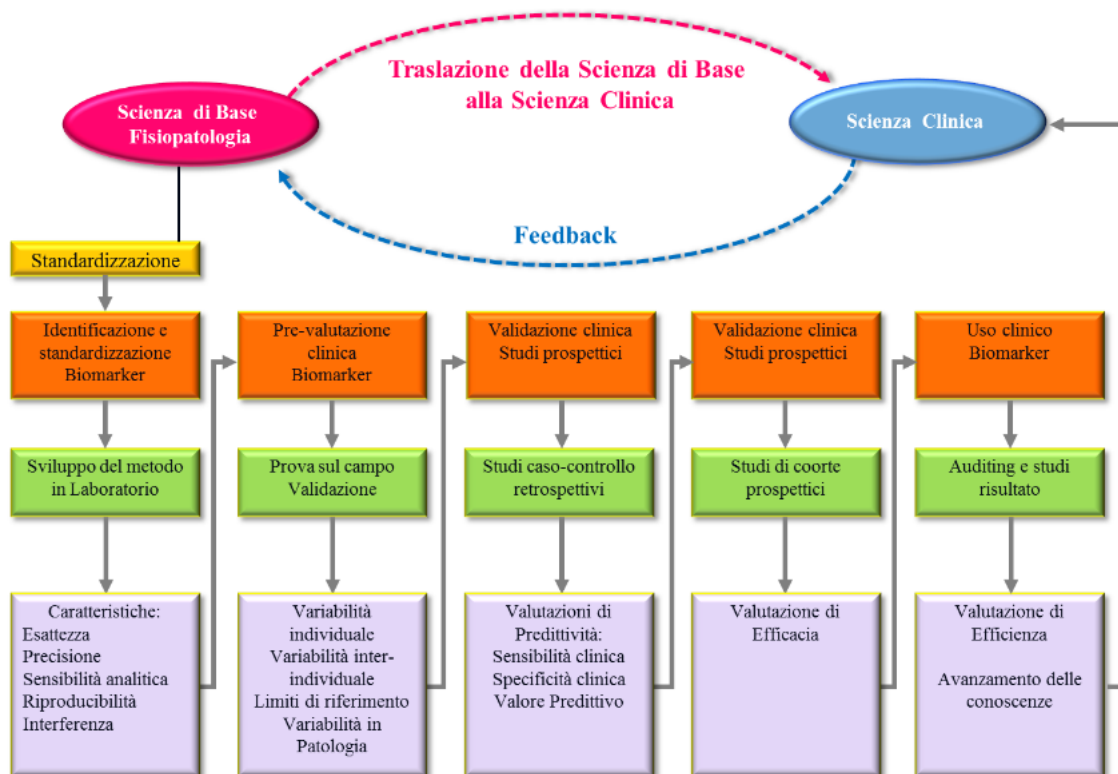
Medicina di laboratorio (Professor Pasquinelli): la medicina di laboratorio è una scienza clinica applicata che studia con metodi chimici, fisici e biologici le alterazioni dell'organismo nello stato di malattia, ricavando, da campioni biologici provenienti dal paziente, dati quantitativi o qualitativi che consentano al medico di ottenere informazioni utili a scopo diagnostico, terapeutico, preventivo, prognostico e riabilitativo.

Differenza tra le figure professionali:

- Il patologo diagnostico trae informazioni che consentano di ottenere una diagnosi;
- Il **laboratorista** è colui che fornisce i dati mediante metodi fisici, chimici e biologici, con estrema precisione, accuratezza e ripetitività.

Tutti i metodi di laboratorio, oggi patrimonio del laboratorio clinico, sono stati precedentemente sviluppati nel laboratorio di ricerca di base e poi trasferiti alla clinica. Questa stretta interdipendenza è, ormai, acquisita e ha portato alla definizione di *medicina traslazionale* (la medicina che, dalla ricerca, si trasla alla clinica).

Ogni metodo utilizzato per la caratterizzazione di un biomarker, in realtà, dovrà sempre essere prima sviluppato in un laboratorio di ricerca, attentamente valutato per le caratteristiche di esattezza, precisione, sensibilità, riproducibilità e, solo una volta valutate queste caratteristiche, attraverso una serie di passaggi, verrà validato e reso disponibile per l'utilizzo nella clinica.



Il processo di traslazione dalla ricerca di base al laboratorio di patologia clinica

IMPORTANTE: tenere a mente che qualunque tecnica presenta **duplice applicabilità**, sia nel laboratorio di ricerca che nel laboratorio di base.

Qual è l'oggetto dei metodi di laboratorio? Liquidi e tessuti biologici da cui si possono trarre informazioni.

Normalmente, per lo studio di fenomeni scientifici, si sceglie un sistema estremamente semplice, tanto da poter consentire informazioni di carattere generale estendibili a quanto accade *in vivo* nel paziente. Quest'extrapolazione non è sempre possibile. Non sempre ciò che succede in un sistema semplice, quale una cellula isolata o un tessuto, ricalca ciò che succede in vivo nell'uomo.

Il passaggio dal sistema sperimentale a ciò che realmente succede è qualcosa di insuperabile.

Si cerca di creare un bypass a quest'ostacolo scegliendo un sistema ottimale e mantenendolo, in condizioni artificiali che riflettano ciò che succede in vivo.

Un **sistema biologico** può essere qualunque cosa: l'animale, nel suo massimo grado di organizzazione funzionale, ma anche fettine di organo o singole colture di cellule isolate, fino a giungere a grossi costituenti molecolari, come proteine o acidi nucleici (questo succede nei test molecolari).

La scelta dell'opportuno sistema biologico dipende dal tipo di informazioni che se ne vogliono ottenere. Il primo passaggio è l'attenta valutazione dei vantaggi e delle limitazioni che un certo sistema presenta per la soluzione di uno specifico problema biochimico. Quasi sempre si utilizzano, per ricevere risposte, sempre più di un unico sistema biologico e più di un singolo approccio metodologico: ormai **la ricerca biomedica**, quindi anche la clinica, **è interdisciplinare**, ovvero utilizza sistemi biologici e approcci metodologici integrati anche molto diversi fra loro, ma complementari. È proprio questa multidisciplinarietà nell'analizzare gli analiti (anche singoli) che ha consentito, negli ultimi 20 anni, un enorme balzo in avanti riguardo i meccanismi molecolari dei sistemi biologici e, quindi, sottesi a numerose patologie umane.

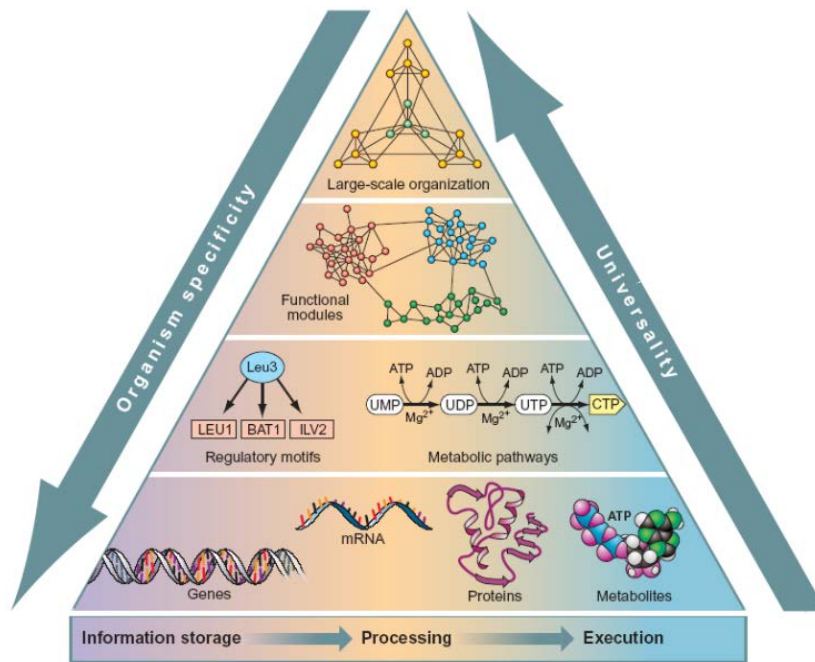
La comprensione dei processi biologici a livello molecolare è progredita enormemente negli ultimi 20 anni. Due sono stati gli elementi fondamentali in tale progresso:

- Sviluppo tecnologico
 - Studio di popolazioni cellulari omogenee
 - Purificazione di proteine
 - Purificazione di acidi nucleici
 - Determinazione della struttura delle proteine e degli acidi nucleici e della loro dinamica molecolare
 - Espressione di proteine in organismi eterologhi
- Approccio multidisciplinare (chimico, biochimico, genetico)

Qualora si volesse studiare l'attività biologica di una sostanza, si può attuare almeno a 3 diversi livelli ben distinti

- Molecolare, es. l'attività pro o antitumorale di un farmaco può essere valutata a livello genetico, quindi dell'attività trascrizionale genica;
- Cellulare, es. la modulazione dell'attività tumorale sui processi intracellulari o di popolazione;
- Organismico, es. le ripercussioni metaboliche sistemiche del farmaco.

Ognuno di questi diversi livelli utilizza sistemi biologici di studio specifici, ciascuno capace di dare risposte specifiche, diverse, ma complementari alle diverse domande che il ricercatore si pone.



Oltvai & Barabasi, Life's complexity pyramid, *Science* 2002

Volendo schematizzare gli approcci sperimentali (entrambi i modelli non sono mai mutualmente esclusivi e sufficienti presi singolarmente):

- **Metodi in silico (*dry lab*)**, utilizzano pressoché esclusivamente l'informatica. Lo sviluppo di sempre più software e l'informatica hanno consentito di rendere disponibili delle banche dati online di tipo genetico e proteico fondamentali, perché consentono di accedere immediatamente al funzionamento, ai meccanismi molecolari relativi a qualunque gene o proteina di interesse biologico. Queste banche dati raccolgono tutte le informazioni derivanti da tutta la letteratura scientifica e dalle analisi di laboratorio effettuate nel momento stesso in cui essa viene prodotta.



NCBI – National Center for Biotechnology Information, gestisce un gran numero di database, tra cui:

- **Gene**, contiene dati inerenti i geni di tutte le specie caratterizzate, quali la struttura genica ed il contenuto genomico, le ontologie, le interazioni con altri geni ed i link alle sequenze ed alle relative pubblicazioni;
- **Nucleotide**, contiene le sequenze nucleotidiche di tutte le specie caratterizzate, siano esse codificanti o meno;
- **Protein**, ha la stessa struttura di Nucleotide, ma è relativo alle sequenze amminoacidiche;

- *PubMed*, è il database delle pubblicazioni scientifiche di carattere biologico e biomedico. Per ogni articolo è disponibile l'abstract. Pubmed Central contiene articoli completi scaricabili gratuitamente;
- *Taxonomy*, contiene la classificazione dei vari organismi.

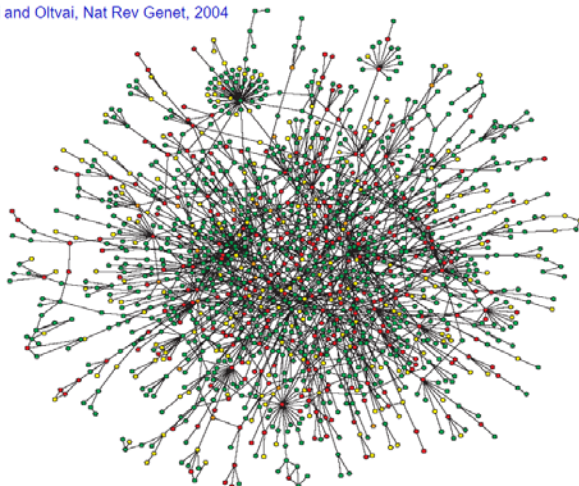
Vi sono software, hardware che consentono di mimare processi complessi, la meccanica dei fluidi, la distribuzione di un certo farmaco sulla base di pochissimi punti sperimentali. Uno dei maggiori progressi in medicina sono avvenuti in chirurgia, proprio grazie alla disponibilità di strumentazioni sempre più complesse, che consentono di individuare sempre con maggiore accuratezza la presenza di una massa.

I modelli in silico risultano fondamentali, in quanto velocizzanti di molto la sintesi di molecole farmacologiche in grado di bloccare o attivare un sito catalitico di un enzima o attivando o meno specifici recettori molecolari.

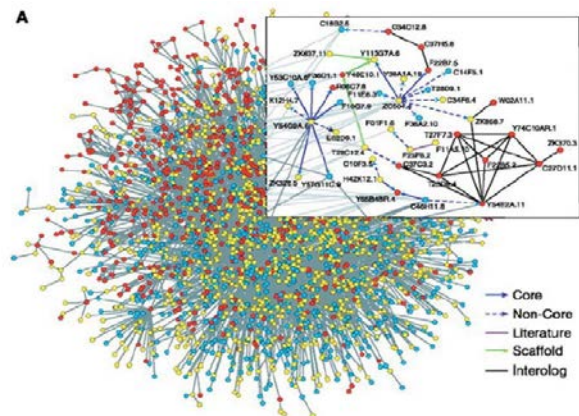
L'ingresso dell'informatica nella ricerca biomedica ha consentito l'evoluzione delle **scienze omiche** (genomica, trascrittomica, proteomica, quelle discipline utilizzanti tecnologie di analisi che consentono la produzione di informazioni in numero molto elevato, utili per la descrizione e l'interpretazione del sistema biologico studiato) e la creazione di una **“biologia delle reti”**. Oggi, infatti, si cerca di catalogare, grazie alle tecniche disponibili, tutte le molecole identificate e le loro specifiche interazioni. Un'applicazione pratica è data, ad esempio, dalla tecnologia dei microarray: in un unico esperimento, si possono avere informazioni sul funzionamento di numerosissimi geni o valutare tutte le interazioni tra proteine trascrizionali e geni.

Questi metodi consentono un disegno molto più rapido delle molecole aventi attività farmacologica, ma non possono sostituire l'analisi tramite campioni biologici.

Barabasi and Oltvai, Nat Rev Genet, 2004



Mapa delle interazioni proteina-proteina nel lievito (*S. cerevisiae*)

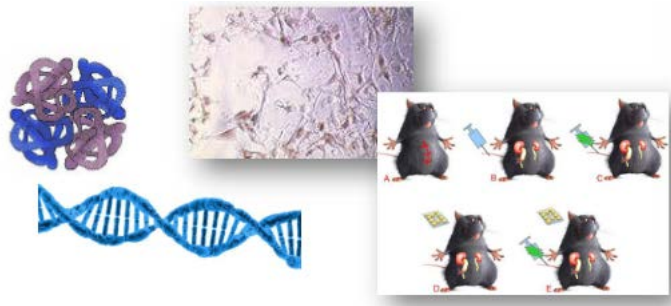


Network di interazione proteica nel verme *C. elegans*

- **Metodi biologici (*wet lab*)**, utilizzano i sistemi biologici precedentemente enunciati.
 - Studi *in vivo*, organismi interi o organi isolati e mantenuti vitali mediante perfusione. Hanno un grande vantaggio: un certo fenomeno può essere analizzato complessivamente. Ciò che non si può effettuare sui sistemi in vivo è l'analisi di un meccanismo molecolare, un targeting molecolare di un certo farmaco a causa delle interazioni cellula-cellula, fra i diversi organi e così via;
 - Studi *in vitro*, il materiale biologico viene mantenuto in un ambiente artificiale, in condizioni quanto più possibile vicine a quanto avviene in vivo.

Vantaggi: riduzione delle limitazioni biochimiche e fisiologiche imposte dalla contiguità cellulare (es. le colture cellulari facilitano lo studio della crescita e del metabolismo);

Svantaggi: possibilità che si verifichino incidenti di laboratorio; presenza di artefatti, per cui la comparazione alla situazione *in vivo* potrebbe non essere sempre giustificata.



Bisogna prestare attenzione alle **soluzioni fisiologiche** utilizzate, che devono avvicinarsi strettamente alle caratteristiche del tessuto intatto oggetto di studio:

- **Isotonica**, deve possedere la stessa pressione osmotica del tessuto in oggetto;
- **Supplementata**, se necessario con
 - Vitamine
 - Amminoacidi
 - Fattori di crescita
 - Aggiunte proteiche, rappresentate da plasma o siero
 - Antibiotici, quali streptomina, penicillina, gentamicina, antifungini (quali la griseofulvina). Tutte sostanze prevenienti le contaminazioni da microorganismi;
 - Fonti di carbonio, come il saccarosio, che, a causa dell'interferenza con alcuni dosaggi enzimatici, è spesso sostituito con il mannitolo, zucchero metabolizzato dalle cellule;
- **Tamponata** allo scopo di garantire l'integrità metabolica (per esempio controllo del pH nei liquidi intra ed extracellulari);
- **Bilanciata di sali** (NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, NaHCO₃, KH₂PO₄).

Le concentrazioni plasmatiche degli ioni presentano **specie-specificità**.

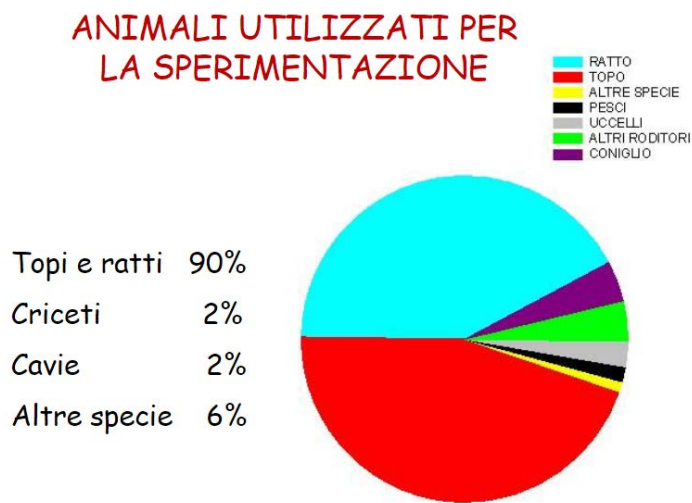
Concentrazioni di alcuni elettroliti (mM) e delle proteine (g/100 ml) nel plasma di alcune specie

	Uomo	Ratto	Porcellino d'India
Na ⁺	150	151	145
K ⁺	3.6	5.9	7.4
Cl ⁻	102	110	105
Ca ²⁺	2.4	2.5	2.2
proteine	7.0	6.3	5.4

Modelli in vivo: possono essere organi isolati e perfusi, sezioni di organi e tessuti o animali da laboratorio (prediletti), il cui uso è ormai nella routine della ricerca biomedica di base e preclinica. L'indagine dell'animale è considerata una tappa necessaria per il trasferimento dei risultati alla clinica, ma anche per la preparazione di vaccini, anticorpi e tutta una serie di prove tossicologiche.

Nonostante tutti i problemi di ordine etico e morale, il loro utilizzo è sempre stato finalizzato allo studio dell'eziopatogenesi con lo scopo di formulare eventuali terapie. Qualunque animale può essere utilizzato, quelli di più largo uso sono topi, ratti e cavie, perché più facili da maneggiare, da stabulare e più a basso costo. Hanno, inoltre, anche maggiore capacità riproduttiva.

L'importanza dei risultati derivati dalla sperimentazione e la diffusione della loro estrapolazione dipendono dalla scelta di un adeguato modello e dalla natura della ricerca.



IMPORTANTE: Quando si lavora con gli animali da laboratorio, vi sono dei fattori da tenere sotto controllo, un po' come quando si conduce un'analisi su una corte di pazienti, bisogna cercare di minimizzare la variabilità fra gli animali. Questi devono essere sempre uguali per ceppo biologico, età sesso, condizioni di stress, ritmo circadiano, stato nutrizionale, che condizionano i processi fisiologici dell'organismo.

Tutti gli esperimenti devono essere condotti su gruppi di animali più piccoli possibile, ma sufficienti affinché il dato

ottenuto abbia significatività statistica. I risultati vanno sempre comparati rispetto a un gruppo di animali di controllo, con stesse caratteristiche, ma che ricava una sostanza placebo, quindi inerte.

La maggior parte degli studi condotti riguarda il metabolismo di **xenobiotici**, soprattutto farmaci. Questo tipo di approccio consente di monitorare la diversa concentrazione che il farmaco somministrato ha nei diversi fluidi dell'organismo. Una delle tecniche è l'**autoradiografia a corpo intero**, che permette di monitorare la distribuzione, l'eventuale accumulo e la rapidità di eliminazione di sostanze estranee somministrate previa marcatura attiva.

1. Il composto che si vuole testare viene marcato con un radioisotopo, iniettato, inoculato nell'animale, congelato in N₂ liquido ($T \leq -195^{\circ}\text{C}$);
2. L'animale viene, poi, fissato in una retina (gomma d'acacia) a bassa temperatura;
3. Sezionamento;
4. Le sezioni ottenute vengono poste a contatto con una lastra autoradiografica a bassa temperatura ($-20/-80^{\circ}\text{C}$ per 1-2 settimane), affinché essa possa risultare impressionata: le zone più scure indicano gli organi o le regioni in cui il radioisotopo si accumula.

Studio autoradiografico di Ullberg ed Ewaldsson: studio sul comportamento dello iodio e del NIS durante la gravidanza, nella mammella e, in particolare, nei tessuti fetali dei mammiferi. Dopo un solo minuto dall'iniezione endovenosa dell'I-131, si evidenzia la precocissima e rilevante captazione degli epitelii orale, salivare, gastrico e, successivamente, anche della ghiandola mammaria della topolina gravida. Dalla mucosa gastrica, lo iodio viene secreto nel succo gastrico e riversato nell'intestino, dove viene riassorbito e ricaptato da stomaco e tiroide, creando una

circolazione salivare e gastro-enterico-tiroidea dello iodio, che si perpetua fino ad eliminazione completa per via reno-vescicale.

Lo stomaco, più della tiroide, sembra avere un primitivo ruolo centrale nel metabolismo dello iodio su scala evolutiva. Dopo 5 giorni, lo radioiodio è ancora ben visibile nelle pareti dell'aorta e, dopo 14 giorni, è visibile solamente nella tiroide, nell'aorta e nella pelliccia dei ratti.

FRAZIONAMENTO PROTOCOLLO SPERIMENTALE (SCHEMA):

- **Informazioni sull'animale di laboratorio**
 - Specie utilizzata (ratto, topo, cavia, ecc.), ceppo, ditta fornitrice, sesso, peso, età, digiuno (sì/no), eventuali trattamenti (reserpinizzato, ecc.), anestesia, metodica di sacrificio, note;
- **Informazioni sulle soluzioni preparate**
 - Soluzioni fisiologiche di perfusione
 - Soluzioni madri
 - Pesata
 - Diluizione
 - Raccomandazioni per la conservazione della soluzione madre
 - Note (preparare fresca ogni giorno, agitare prima dell'uso, ecc.)
- **Analisi dei risultati**
 - Raccolta dei tracciati, stampati, ecc.
 - Immagazzinamento dei dati nel computer
 - Catalogazione
 - Elaborazione dei dati raccolti
 - Produzione di un grafico
 - *Annotazioni/osservazioni*, spesso forniscono le informazioni più importanti per la comprensione dei risultati e, quindi, dell'intero esperimento.



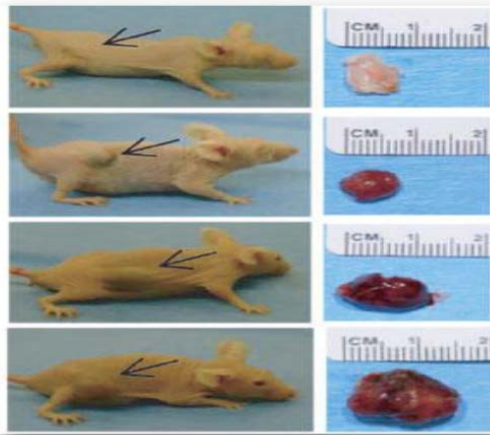
Nude mouse: scoperto nel 1962, modello animale più utilizzato, derivante da un progenitore in cui un tratto mutante portato in omozigosi recessiva ha fatto sì che il topolino non sviluppasse la pelliccia. In lui si ha un'incompleta formazione o assenza totale del timo, che comporta deficienza di linfociti T. esso è caratterizzato da una grave compromissione del sistema immunitario (immunodepresso). Ciò fa sì che gli si possano impiantare cellule provenienti da altre specie senza che si abbia

rigetto. Precedentemente questo tipo di approccio avveniva in zone a basso rigetto (come la camera anteriore dell'occhio o le tasche della guancia, ma non si riusciva). Si ottiene, così, un ulteriore modello animale, il **modello murino xenograft** (gr. Xeno- = esterno, definisce il trapianto di cellule, tessuti o organi tra esseri viventi di diverse specie). Si parla di

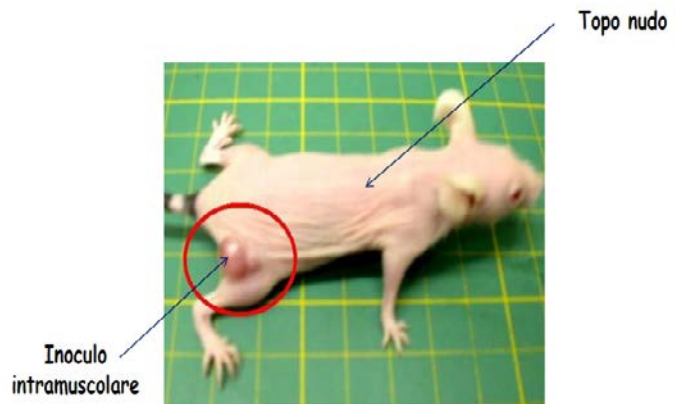
- Modelli ectotopici, se cellule/tessuti vengono impiantati a livello sottocutaneo;
- Modelli ortotopici, se cellule/tessuti vengono impiantate direttamente all'interno dell'organo.

Tumori solidi da cellule umane

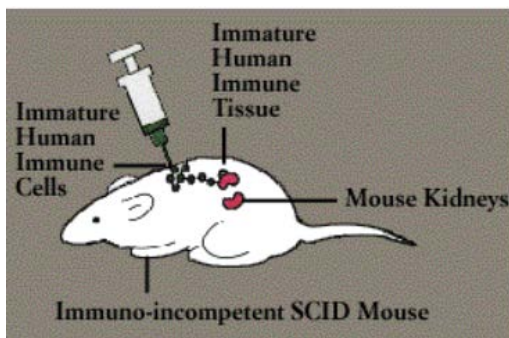
Inoculo sottocutaneo



Tumori solidi da cellule umane



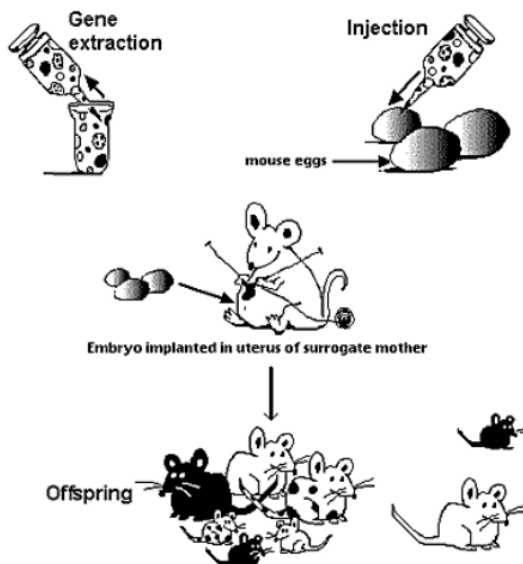
Oggi si parla di terapia guidata sui sintomi, dunque **patient-derived xenograft (PDX)**, ovvero un topo nudo in cui viene impiantato il tumore derivato dal paziente. Ciò consente di valutarne meglio l'eterogeneità, nell'ottica di una **medicina sempre più personalizzata**.



Scid mouse: scoperto nel 1963, molto simile al topo nudo, ma con totale compromissione e assenza del sistema immunitario a causa della mancanza di un enzima necessario per il suo sviluppo. È utilizzato in tutti gli studi di immunologia e malattie infettive.

S.C.I.D.: Severe combined immune deficiency.

Topi inbred: molto utilizzati in genetica, che derivano dall'incrocio tra nati della stessa cucciolata per un numero maggiore di 20 generazioni (i topi si riproducono molto rapidamente, fattore utilissimo in laboratorio). I topi derivanti da incroci ripetuti di componenti della stessa cucciolata hanno identico patrimonio genetico, mantenendo quello del proprio ceppo, come ad avere tanti gemelli omozigoti.

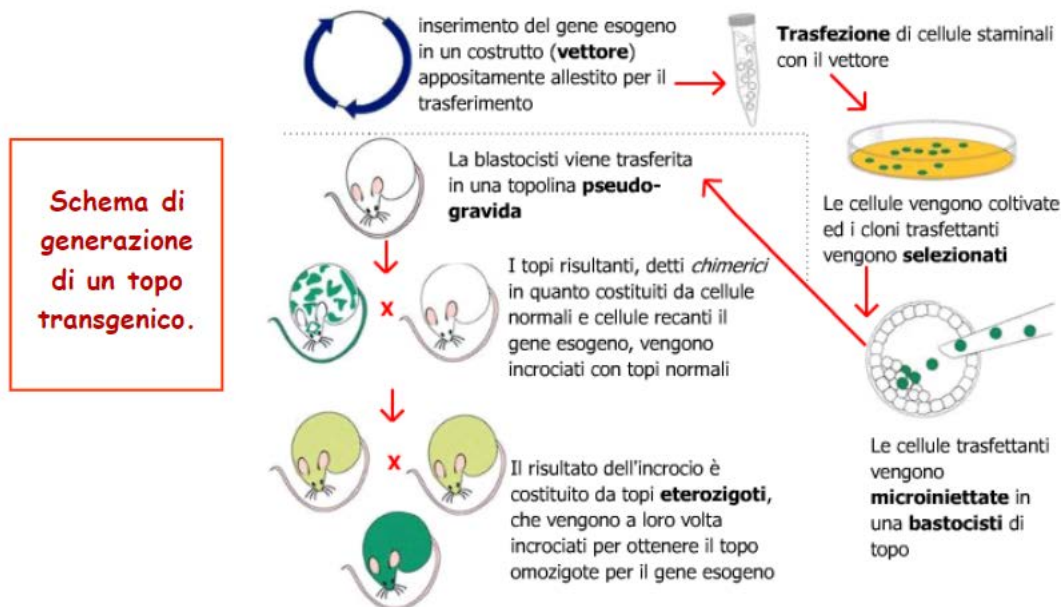


Topi transgenici knock-in o knock-out: in essi si fa over esprimere o si annulla un certo gene, mediante ingegneria genetica. Del gene di interesse da studiare si conosce solo la frequenza, ma non si sa che funzione abbiano nell'organismo. Per comprendere quest'ultima, il gene che si vuole studiare viene inserito nel genoma di una cellula uovo che, a sua volta, viene trapiantata in una madre adottiva, che darà origine a un **topo-chimera**.

[In genetica, il termine **chimera** indica la presenza, nello stesso organismo, di cellule con un diverso genoma. Questo topo, infatti, avrà sia cellule esprimenti geni della madre che cellule esprimenti il gene inserito. Viene, poi, fatto accoppiare con un topo normale con conseguente cucciolata di topi eterozigoti, che verranno

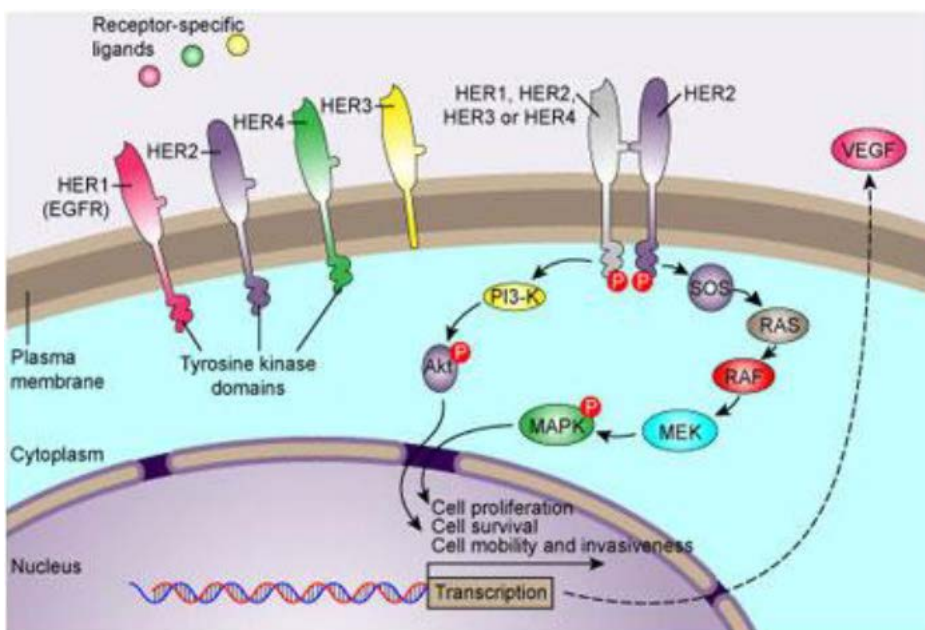
fatti incrociare e, per ogni generazione, genotipizzati, per individuare la presenza di un omozigote rispetto al gene scelto]. In base alla sequenza genica selezionata

- Se essa è silenziata, si parla di **knock-out**;
- Se ne viene inserita una che verrà over espressa o che normalmente non è espressa nel modello murino, si parla di **knock-in**.



Questo tipo di approccio ha consentito di individuare la funzione un protooncogene (**HER2**), appartenente alla famiglia degli *Human Epithelial Growth-Factor Receptor* (ha forte omologia di sequenza e funzionale con l'EGF Receptor). Questa famiglia comprende quattro diversi componenti, tutte proteine recettoriali transmembrana con

- un dominio extracellulare intramembranario per il ligando;
- un dominio intracitosolico avente attività tirosinachinasica.



Tutti possono funzionare in maniera ligando-dipendente o indipendente. Per HER2 non è stato ancora individuato un ligando specifico, ma si è notato che esso, tra i quattro fattori della famiglia, dimerizza con uno degli altri tre componenti, indipendentemente dal ligando, per formare un recettore completo. Ciò fa sì che la via di segnalazione all'interno

della cellula rimanga costantemente attiva. In seguito alla dimerizzazione, viene attivato il **dominio tirosinchinasico**, che porta all'attivazione di pathway correlati ai processi connessi a crescita e

sopravvivenza cellulare. L'attivazione incontrollata di questo recettore provoca una crescita sregolata.

Questo gene è amplificato e la proteina che esso codifica è over espressa in una percentuale fra 10 e 34%. Si è notato che le pazienti con carcinoma mammario over esprimente HER2 presentano prognosi peggiore. È, però, espresso anche in carcinomi quali quello ovarico, dello stomaco, polmonare ed uterino. Questa funzione è stata identificata proprio grazie all'impiego di topi knock-in, in cui questa funzione genica è stata over espressa. Proprio nei topi transgenici, si è notato che quelli esprimenti troppo HER2 presentavano lesioni mammarie già dalla 16^a settimana, con tumore palpabile già alla 25^a settimana ed alta capacità di sviluppo metastatico.

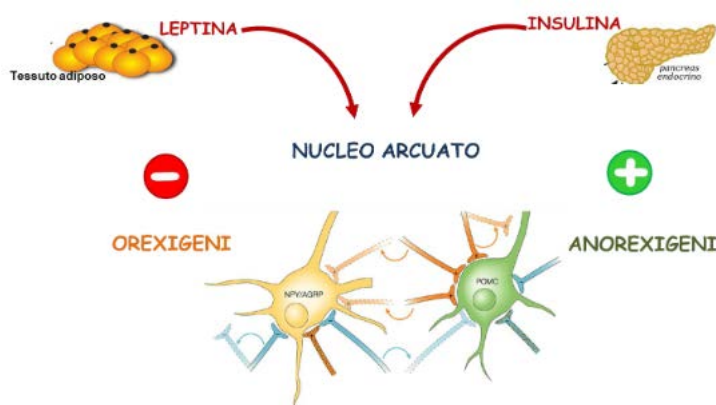
Ancora oggi si utilizzano topi knock-in per HER2 per la sintesi di vaccini contro lo sviluppo di tumori spontanei o per testare farmaci capaci di bloccare il CARCINOMA MAMMARIO. Oggi, nella terapia verso i tumori mammari over esprimenti HER2, si utilizza l'immunoterapia con anticorpi monoclonali, ma si preferiscono i topi per non far sviluppare immunoresistenza alla terapia nei pazienti.

Un diverso punto di partenza per comprendere a cosa serve un gene è di osservare cosa accade ai **mutanti negativi**, cioè a quegli organismi nei quali quel gene è **inattivo**. Così, quando i ricercatori isolano un gene umano dalle funzioni ignote, per comprenderne la funzione inseriscono nel topo una sequenza inattiva del gene isolato, rimpiazzando quello stesso gene presente nell'animale. In questo modo, viene creato un particolare tipo di topo transgenico, il topo **knock-out**, privato cioè di quella certa funzione genica. Un approccio del genere ha portato all'identificazione della funzione del gene OB.

Gene OB: gene dell'obesità, perché, se silenziato, porta all'obesità), codificante per la leptina.

Leptina: ormone peptidico deputato al senso di sazietà, secreto dagli adipociti in maniera proporzionale alla massa grassa presente.

1. Ormone anoressigeno, agente sul nucleo arcuato per bloccare l'appetito, inibendo gli ormoni oressigeni e attivando gli anoressigeni;

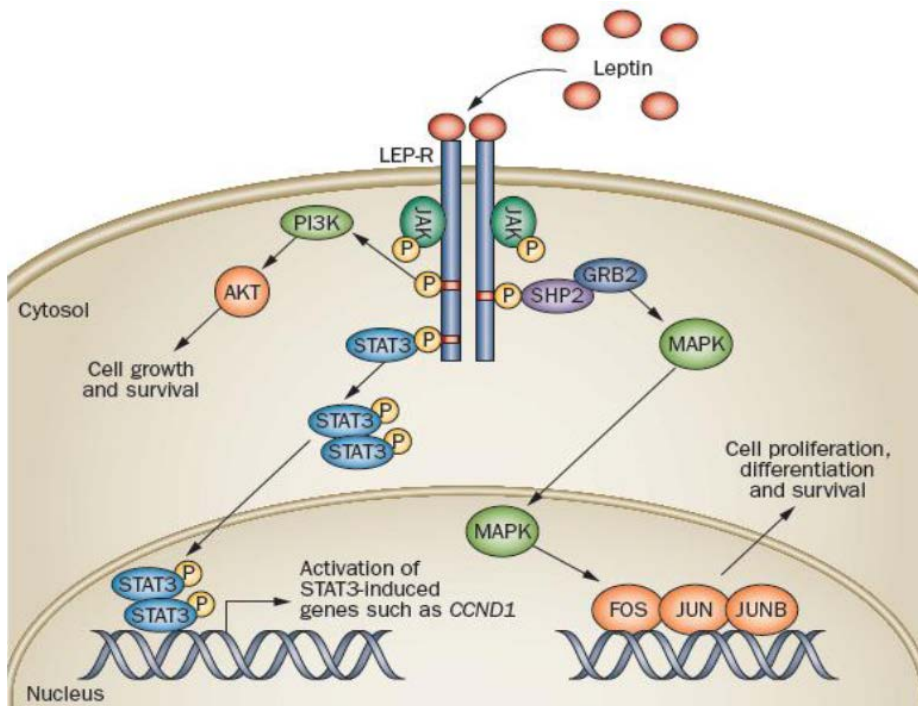


2. Azione simile a quella svolta dall'insulina, ma, mentre la sua secrezione postprandiale è immediata, quella della leptina è lenta;

3. Funziona anche in caso di digiuno e dà segnali indipendentemente dalle variazioni di peso corporeo. Agisce legando recettori di membrana peptidici.

Ne esistono varie isoforme del recettore, dovute a splicing alternativi, le due più comuni sono quella breve e quella lunga (deputata alla trasmissione del segnale). Una volta attivato questo recettore, si attivano dei pathway:

- Pathway di STAT3, il principale;
- Pathway delle MAPK, dunque proliferativi;
- Pathway della PI3K, deputato alla sopravvivenza cellulare.

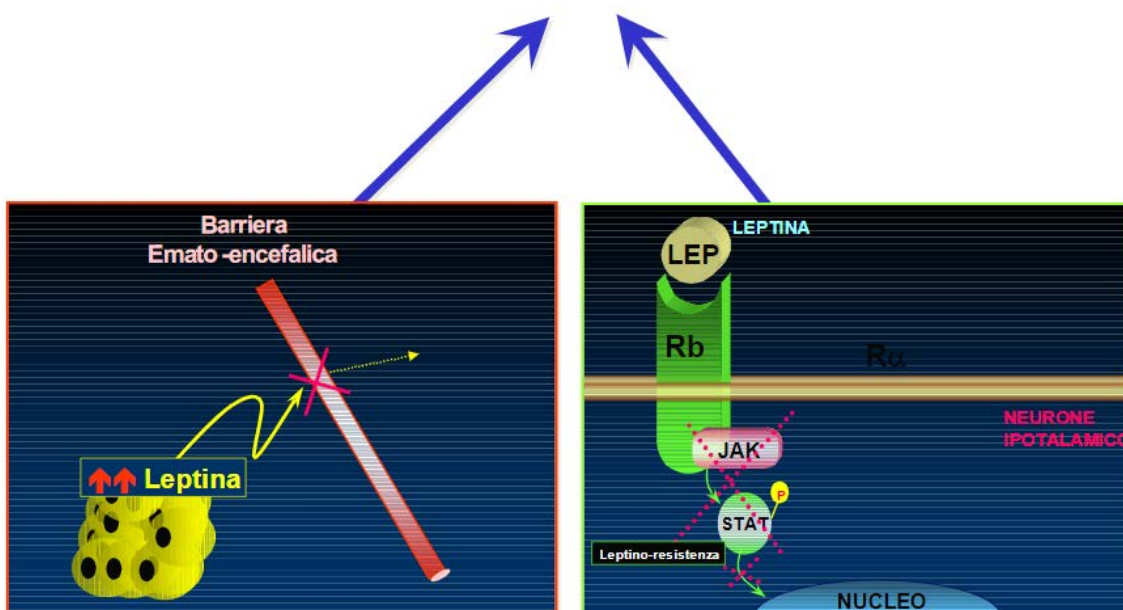


La leptina svolge anche altre funzioni. Nei soggetti sovrappeso ed obesi è secreto in quantità elevata, poiché secreto dagli adipociti in maniera proporzionale al quantitativo di massa grassa presente, per aumentare il senso di sazietà e ripristinare la normalità del metabolismo.

Quando è stata scoperta la funzione del gene OB, i ricercatori pensavano di aver individuato una cura contro l'obesità. In realtà, non è stato così, poiché, per cause ancora sconosciute, nei soggetti obesi si sviluppa leptino-resistenza per processi mutazionali a carico di

- Trasportatore della leptina tramite la barriera ematoencefalica;
- Porzioni intracitosoliche del recettore peptidico, che non può agire a livello ipotalamico.

LEPTINO-RESISTENZA



A livello periferico, comunque, agisce sui tessuti, dove attiva pathway proliferativi, non riuscendo a controllare il senso di appetito, ma agendo comunque a livello periferico. Per questo la condizione di obesità è stata identificata come fattore di rischio nelle donne per il carcinoma mammario (la mammella contiene una quota di tessuto adiposo importante e la leptina può favorire l'insorgenza di tumore mammario). Topi ob/ob (knock-out per il gene codificante la leptina) e db/db (knock-out per il recettore della leptina) mostrano obesità, infertilità, iperglicemia e iperinsulinemia.

La somministrazione di leptina in topi del genere riporta immediatamente al ripristino di una situazione fisiologica e corregge eccesso di peso, iperfagia e infertilità.



I vantaggi dei modelli in vivo sono enormi. Questi sono modelli di maggiore significato predittivo. Riflettono l'eterogeneità cellulare o genetica, che si ha anche nei diversi pazienti.

Gli svantaggi sono rappresentati dal tempo necessario per il corretto modello sperimentale da analizzare e va considerato che non sempre (anzi, per una percentuale piuttosto alta) ciò che si vede nel topo sia riscontrabile nell'uomo.