

LE COLTURE CELLULARI ANIMALI

Una **coltura cellulare** è un gruppo omogeneo di cellule **eucariotiche**, di origine tissutale, in grado di crescere e moltiplicarsi *in vitro* per numerose generazioni. È possibile coltivare in laboratorio sia cellule di origine animale che vegetale. Le colture cellulari vengono mantenute in terreno liquido all'interno di contenitori sterili (fiasche, bottiglie o capsule Petri) in particolari condizioni sperimentali che riproducono le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente cellulare naturale.

I primi studi relativi alla possibilità di coltivare in ambiente artificiale **cellule di origine animale e umana** risalgono al XIX secolo quando W. Roux nel 1885 riuscì a mantenere per alcuni giorni *in vitro* cellule di cervello di un embrione di pollo. Successivamente diversi furono i tentativi per coltivare numerosi tipi di cellule isolate da diversi organismi viventi, ma i progressi decisivi si ebbero nel 1943, quando Earle riuscì a coltivare le prime linee cellulari di mammifero, e dieci anni più tardi con Scherer che mise in coltura la prima linea cellulare tumorale umana, denominata **cellule HeLa**. Le cellule HeLa sono così chiamate dal nome di Henrietta Lacks, una paziente affetta da tumore da cui queste cellule vennero prelevate a scopo diagnostico. Ancora oggi le cellule HeLa, in grado di dividersi indefinitamente, sono coltivate e costituiscono oggetto di studio in numerosi laboratori. Grazie allo sviluppo delle tecniche di sterilità e all'uso di terreni di coltura sempre più completi e perfettamente bilanciati nei loro componenti, l'utilizzo delle colture cellulari di animale si è fortemente ampliato ed è diventato uno strumento insostituibile in quanto ha permesso di usufruire di un **“sistema modello”** semplificato e riproducibile per lo studio della biochimica e della fisiologia cellulare. Numerose sono le applicazioni in numerosi campi della ricerca scientifica. Attualmente le colture cellulari vengono utilizzate:

- per la produzione di sostanze farmacologicamente attive (anticorpi, vaccini, fattori di crescita ecc.);
- nei test di tossicità di farmaci, prima che questi vengano saggiati sugli animali o sull'uomo;
- nei test di ecotossicità, per valutare l'effetto di inquinanti ambientali;
- negli studi relativi ai meccanismi della fisiologia e dello sviluppo cellulari;
- negli studi oncologici;
- nella diagnosi di malattie genetiche;
- nella creazione di organismi transgenici.

L'impiego delle colture cellulari, accanto ai numerosi vantaggi rappresentati soprattutto dalla possibilità di controllare e standardizzare le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente in cui si opera, dalla relativa semplicità delle condizioni sperimentali e dalla loro riproducibilità e da rapidi tempi di risposta, presenta però alcuni limiti:

- condizioni oggettivamente diverse rispetto a quelle *in vivo*;
- possibilità di studiare solo la tossicità acuta, ma non quella cronica di una sostanza;
- impossibilità di studiare i complessi fenomeni di interazione cellulare;
- facilità di contaminazione da parte di microrganismi;
- possibilità di alterazioni e mutazioni.

Come si ottengono le colture cellulari

Le cellule che costituiscono le colture cellulari si ottengono in seguito a **espianto** di organi, biopsie di tessuti animali che vengono chirurgicamente rimossi e frammentati meccanicamente o per via enzimatica fino a ottenere una sospensione cellulare che viene trasferita in appositi contenitori sterili di vetro o di plastica (**figura 1**).

Per ricreare *in vitro* l'ambiente più simile a quello presente in natura, le cellule sono immerse in un adeguato **terreno di coltura**, cioè una soluzione isotonica che contiene le sostanze nutritive, i sali minerali, gli aminoacidi, i fattori di crescita necessari per la loro crescita. Le cellule sono quindi mantenute alla temperatura idonea costante all'interno di adatti sistemi di incubazione.

Nelle condizioni ambientali ottimali le cellule dei tessuti connettivi, epiteliali, del sistema nervoso (tessuti solidi) aderiscono al substrato assumendo la loro forma caratteristica e iniziano a moltiplicarsi dando origine a una **coltura primaria**. Le cellule crescono fino a occupare tutta la superficie del contenitore (fiasca) arrivando così a confluire in un unico strato. In questa fase le **cellule normali** cessano di crescere a causa del fenomeno dell'inibizione da contatto ed entrano nella fase di quiescenza, per cui per mantenerle in vita è necessario trapiantarle (o passarle) in altre fiasche con opportuno liquido di diluizione.

Le **cellule tumorali**, invece, se le condizioni ambientali lo consentono, continuano a crescere impilandosi le une sulle altre in quanto non risentono dell'inibizione da contatto.



Figura 1 Recipienti per colture cellulari (Shutterstock Images LLC).

I trapianti (o passaggi) si eseguono grazie all'utilizzo di un enzima, la **tripsina**, che favorisce la digestione delle glicoproteine di membrana che ancorano le cellule al substrato. Tecnicamente questa fase operativa viene detta tripsinizzazione e permette di ottenere una sospensione cellulare che, opportunamente diluita, potrà essere trapiantata in nuove fiasche e consentire la crescita di nuove cellule (mantenimento della coltura).

Le colture primarie di solito sopportano pochi passaggi perché le cellule vanno incontro a un fenomeno di **senescenza**, per cui degenerano e muoiono. A volte alcune cellule di una coltura primaria sono soggette a mutazioni spontanee (o indotte) che ne alterano le caratteristiche cellulari: si può verificare un aumento della velocità di duplicazione e la scomparsa di senescenza. Le cellule diventano così immortali, con crescita illimitata nel tempo. Si forma una **linea cellulare stabilizzata** o continua, in grado di proliferare in modo continuo se mantenuta in adatte condizioni.

Esistono anche **linee cellulari** immortali, dette **trasformate** perché derivano da tumori (come, per esempio, le cellule HeLa) oppure cellule che diventano immortali in seguito a manipolazione genetica (inserimento di oncogeni) o che lo diventano in seguito a trasformazione virale.

Morfologia delle cellule

La morfologia delle cellule in coltura riflette quella del tessuto *in vivo* (**figura 2**). Le cellule dei tessuti solidi crescono in monostrato, **adese** al substrato del contenitore. I fibroblasti assumono la tipica forma fusiforme, le cellule epiteliali quella poligonale.

Le cellule emopoietiche (linfociti, eritrociti) sono cellule che rimangono **sospese** nel terreno di coltura e non aderiscono al substrato della fiasca: come *in vivo* circolano nel flusso sanguigno, così *in vitro* crescono in sospensione assumendo una forma sferica.

Esistono anche linee cellulari, come i linfoblasti-B di scimmia B95-8, che presentano una popolazione eterogenea di cellule di cui alcune sono adese mentre altre crescono in sospensione.

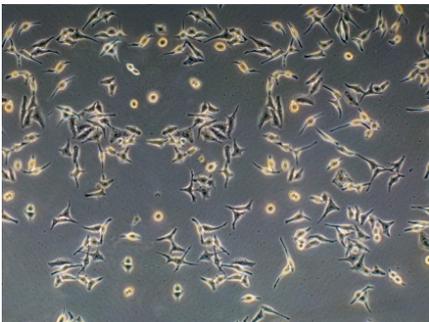


Figura 2 Coltura cellulare al microscopio (Shutterstock Images LLC).

Condizioni colturali

Affinché sia possibile coltivare *in vitro* le cellule, i parametri chimico-fisici ottimali devono riprodurre le condizioni naturali dell'organismo. Per quanto riguarda i parametri fondamentali (terreno di coltura, pH, umidità relativa, esigenze gassose di O₂ e CO₂, temperatura) tutte le cellule hanno in genere le stesse esigenze chimico-fisiche di base. Il **terreno di coltura di base** è una soluzione isotonica e tamponata in grado di fornire tutte le sostanze fondamentali per la sopravvivenza delle cellule.

Se ne conoscono di diversi tipi, che differiscono per la concentrazione delle sostanze fondamentali contenute, di seguito elencate:

- acqua;
- sali minerali (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Cl^- , HCO_3^- ecc.) che contribuiscono a determinare la pressione osmotica del mezzo e il potenziale di membrana delle cellule. Il Ca^{++} favorisce anche l'adesione cellulare e il NaHCO_3 viene aggiunto in numerosi terreni come tampone;
- una fonte di carbonio (glucosio e/o glutamina);
- aminoacidi;
- vitamine;
- indicatore di pH (solitamente il rosso fenolo).

Al terreno di coltura di base viene addizionata una percentuale variabile dal 5 al 20% di **siero fetale bovino** (FBS), ricco di fattori di crescita e ormoni, fattori di adesione (fibronectina), sali minerali utili come cofattori di enzimi, lipidi, proteine (transferrina, albumina) fondamentali per favorire l'adesione, lo sviluppo e la proliferazione cellulare. Attualmente si stanno sperimentando terreni di coltura in cui non è necessario aggiungere il siero bensì solo alcuni fattori di crescita e ormoni alla concentrazione adeguata. Ciò risulta vantaggioso in quanto vengono diminuiti i costi e ulteriormente standardizzate le condizioni di crescita cellulare.

A volte al terreno così formulato vengono addizionati antibiotici e antifungini per prevenire le contaminazioni microbiche.

Il **pH** del terreno deve essere compreso fra 7 e 7,4. Nel terreno è presente un indicatore di pH, il rosso fenolo, che in ambiente neutro è di colore rosso, in ambiente alcalino viola e giallo-arancio a pH acido. Con l'avanzare della proliferazione cellulare il terreno tende ad acidificare perché al suo interno si accumulano ioni H^+ e cataboliti. Il terreno contiene un **sistema tampone** che in genere è quello carbonato/bicarbonato, in grado di garantire al pH condizioni di stabilità almeno fino a quando non si verificano variazioni eccessive. Quando il terreno vira al giallo, l'acidità è troppo elevata e il terreno va sostituito.

Nel termostato viene insufflata CO_2 fino al raggiungimento di una pressione parziale del 5% che corrisponde alla pressione di CO_2 misurata nei tessuti umani e che viene impiegata anche per la regolazione del pH.

Alcuni sistemi tamponanti in uso contengono HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico), molecola organica di sintesi con proprietà anfotere capace di tamponare i terreni senza dover fornire CO_2 .

La pressione parziale dell'ossigeno è invece assicurata dalla presenza dell'aria atmosferica all'interno del termostato.

La **temperatura** ottimale di crescita per **cellule di mammifero** è di 37 °C: viene mantenuta ponendo le colture in uno specifico termostato che assicura non solo il mantenimento della temperatura costante ma anche la percentuale idonea di **umidità relativa**. Nel fondo dell'apparecchio viene infatti aggiunta acqua che, evaporando, evita l'essiccazione del terreno liquido posto nelle fiasche.

Le **cellule aviarie** vengono coltivate a 38 °C e quelle che derivano da animali a sangue freddo alla temperatura dell'ecosistema in cui vivono normalmente tali animali.