



Società Italiana di Citometria

Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

**LA CITOMETRIA A FLUSSO
PER LO STUDIO DELLA
PROLIFERAZIONE CELLULARE**

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini

QUADERNI DI CITOMETRIA

LA CITOMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Copyright © GIC Società Italiana di Citometria

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione, e di adattamento totale o parziale con qualsiasi mezzo
(compresi i microfilm, le copie fotostatiche e copie informatiche)
sono riservati per tutti i paesi.

Supplemento n. 1 a "Lettere GIC"
Periodico della Società Italiana di Citometria
Autorizz. del Trib. di Roma n. 512/92 del 17/09/1992
ISSN 2280-8663
Vol. 27, n. 1 aprile 2018
Direttore Responsabile
Raffaele De Vita

Segreteria GIC:

Società Italiana di Citometria
c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671
e-mail: gic@enea.it <http://www.citometriagic.it>

Stampa:

CSP-STAMPA DI CARLO PIGNANI

Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)
csp.stampa@virgilio.it

INDICE

PREFAZIONE/INTRODUZIONE pag. 6

PARTE PRIMA: METODOLOGIA GENERALE

**1 - MISURA DEL DNA IN COLTURE CELLULARI STUDI
DI CINETICA CELLULARE *IN VITRO*** 7

Simona Ronzoni, Daniele Bergamaschi, Mario Faretta,
Federico Gallinari, Eugenio Erba

INTRODUZIONE

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE

IL PROBLEMA DEI DOPPIETTI

STUDI DI CINETICA CELLULARE *IN VITRO*: POPOLAZIONI SINCRONIZZATE

LINEE CELLULARI

SINCRONIZZAZIONE CON BASSE DOSI DI MTX

COLORAZIONE DEL DNA: ANALISI MONOPARAMETRICA

COLORAZIONE BrdUrd/DNA: ANALISI BIPARAMETRICA

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE BrdUrd/DNA

SINCRONIZZAZIONE CON AFIDICOLINA

APPENDICE

BIBLIOGRAFIA

**2 - CINETICA CELLULARE, *IN VIVO* ED *IN VITRO*, MEDIANTE
CITOMETRIA A FLUSSO** 19

Roberto Orecchia, Elio Geido, Edmondo Infusini,
Angela Di Vinci, Walter Giaretti

INTRODUZIONE

I PARAMETRI DELLA CINETICA CELLULARE

METODO BrdUrd - HOECHST - BROMURO DI ETIDIO

METODO CON ANTICORPI MONOCLONALI ANTI - BrdUrd

CINETICA CELLULARE *IN VIVO*

BIBLIOGRAFIA

3 - MARCATORI DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

pag. 27

Ennio Prosperi

INTRODUZIONE
COSA È UN MARCATORE DI PROLIFERAZIONE CELLULARE
PROTEINE DEL METABOLISMO, SINTESI E STRUTTURA DEL DNA
PROTEINE DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE
REGOLATORI TRASCRIZIONALI
BIBLIOGRAFIA

4 - STIMA DI PARAMETRI CINETICI DI POPOLAZIONI CELLULARI MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO

38

Alessandro Bertuzzi, Alberto Gandolfi,
Carmela Sinisgalli, Giuseppe Starace

LA DISTRIBUZIONE MONOPARAMETRICA DEL CONTENUTO DI DNA
LA DISTRIBUZIONE BIPARAMETRICA DNA-BrdUrd
STIMA DI PARAMETRI CINETICI DEL CICLO CELLULARE DA UNA
SEQUENZA DI ISTOGRAMMI DNA-BrdUrd
STIMA *IN VIVO* DI TS E Tpot DA UNA SINGOLA BIOPSIA
MARCATORI DELL' ATTIVITÀ PROLIFERATIVA
BIBLIOGRAFIA

PARTE SECONDA: APPLICAZIONI IN ONCOLOGIA

1 - MISURA DEL CONTENUTO DI DNA NEI TUMORI SOLIDI

46

Raffaele De Vita, Patrizia Eleuteri

INTRODUZIONE
PRELIEVO DEI CAMPIONI
DISAGGREGAZIONE DEI CAMPIONI BIOPTICI
TRATTAMENTO DI CELLULE IN SOSPENSIONE
CONSERVAZIONE
CAMPIONI FISSATI E INCLUSI IN PARAFFINA
COLORAZIONE
MISURA DEI CAMPIONI
CONCLUSIONI
BIBLIOGRAFIA

2 - ANALISI MULTIPARAMETRICA DEI TUMORI SOLIDI

50

Giuliano Mazzini, Cinzia Ferrari, Simona Leviti

INTRODUZIONE
MATERIALI E METODI
COLORAZIONE PER ANALISI DEL DNA A SINGOLO PARAMETRO
ANALISI BIPARAMETRICA DNA/BrdUrd
ANALISI MULTIPARAMETRICA DNA/BrdUrd/CK
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI
BIBLIOGRAFIA

3 - APPLICAZIONI CLINICHE DELLA MISURA DEL DNA: NEOPLASIE SOLIDE Donatella Tirindelli Danesi	pag. 59
INTRODUZIONE INDICE DI DNA (DNA INDEX, DI) FASE S (PERCENTUALE DI CELLULE NELLA FASE) ETEROGENEITA' INTRATUMORALE LESIONI PRECANCEROSE CONTROLLI DI QUALITA' E STANDARDIZZAZIONE CONCLUSIONI BIBLIOGRAFIA	
4 - ANALISI BIPARAMETRICA DNA/BROMODESOSSIURIDINA (BrdUrd): APPLICAZIONI IN ONCOLOGIA CLINICA Marco Danova	65
INTRODUZIONE CITOMETRIA A FLUSSO E CINETICA PROLIFERATIVA DEI TUMORI ANALISI DEL CICLO CELLULARE MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO ANALISI BIPARAMETRICA CONTENUTO DI DNA/INCORPORAZIONE DI BrdUrd: APPLICAZIONI IN ONCOLOGIA CLINICA CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE BIBLIOGRAFIA	
INDICE DEGLI AUTORI	71

PREFAZIONE/INTRODUZIONE

L'impegno del GIC nel promuovere la formazione dei Citometristi continua con questo "Secondo Quaderno" che arricchisce la serie di sussidi didattici mirati ad affiancare e supportare le varie iniziative formative che la Società mette in campo e che sono ovviamente prevalentemente indirizzate ai giovani Colleghi che si avvicinano alla Citometria. Gli "storici" Corsi GIC della Scuola Nazionale di Citometria a cadenza biennale e i Corsi satelliti alla Conferenza (insieme ad altre iniziative di formazione citometrica) che vengono regolarmente organizzati dalla Società Italiana di Citometria, sono sempre frequentati da giovani neofiti. E' noto che la Citometria a Flusso (CF) non è materia di insegnamento universitario e al più è inserita come integrazione in altri moduli didattici di corsi di Laurea di area biologica; di conseguenza i laureati che accedono poi ai laboratori analitici, basati sulle tecniche citometriche, si trovano sprovvisti dei fondamentali teorico-pratici che queste posizioni richiedono.

Una delle "mission" del GIC è quella di offrire le opportunità formative a quanti necessitano approfondimenti basilari, ma anche a chi si vuole aggiornare professionalmente, magari aderendo al "Progetto di Citometrista Qualificato" messo in campo dal GIC da alcuni anni, con l'istituzione dell' "Elenco dei Citometristi Esperti".

Dopo il "Primo Quaderno" (dedicato ai fondamenti strumentali della CF) questo Secondo è tutto dedicato alla analisi del DNA ed alle ricadute che questa ha determinato in campo clinico. Vale la pena qui ricordare (proprio a livello didattico!!) che la CF nasce infatti dalle esigenze degli anni 60 (del secolo scorso) di sviluppare sistemi di citodiagnostica automatizzata che si ipotizzava potessero rendere meno soggettive (o operatore dipendente) le procedure diagnostiche in ambito oncologico (prevalentemente onco-ematologico). La storia ci ha insegnato che queste ipotesi sono rimaste un sogno.....e l'avvento degli anticorpi monoclonali da un lato e l'emergenza di patologie immunologiche di grande impatto clinico (quali AIDS) dall'altro, hanno successivamente spostato gli obiettivi della CF dal DNA all'immunofenotipo. Ma come in tutti i campi "la storia" è un valore da mantenere e quindi in questo "Quaderno" abbiamo voluto riportare i più importanti contributi (ripresi integralmente dal famoso "Manuale GIC") dei vari Gruppi Italiani che hanno fatto la storia della Citometria in Italia; dalla metodologia per la preparazione dei campioni, anche da tessuti solidi, fino alla marcatura, anche multiparametrica, del DNA, associata ad altre componenti cellulari (proteine ciclo-correlate, marcatori endogeni ed esogeni di proliferazione, citocheratine, ecc) per lo studio accurato della proliferazione cellulare. Infine, sono trattate le principali applicazioni della CF in campo clinico, ovviamente quelle inerenti le problematiche oncologiche, dove l'impatto della proliferazione cellulare era (e in parte ancora oggi è) particolarmente significativo, sia in termini diagnostici che di trattamenti terapeutici, basati sulla chemio e sulla radioterapia.

Raffaele De Vita

Giuliano Mazzini