Vol. 21, Num. 1 Aprile 2012

LETTERE GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

Poste Italiane S.p.A. - Sped. in Abb. Postale - D.L. 353/2003 (Conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1 com. 1 - DCB - Roma

PROGRAMMA PRELIMINARE

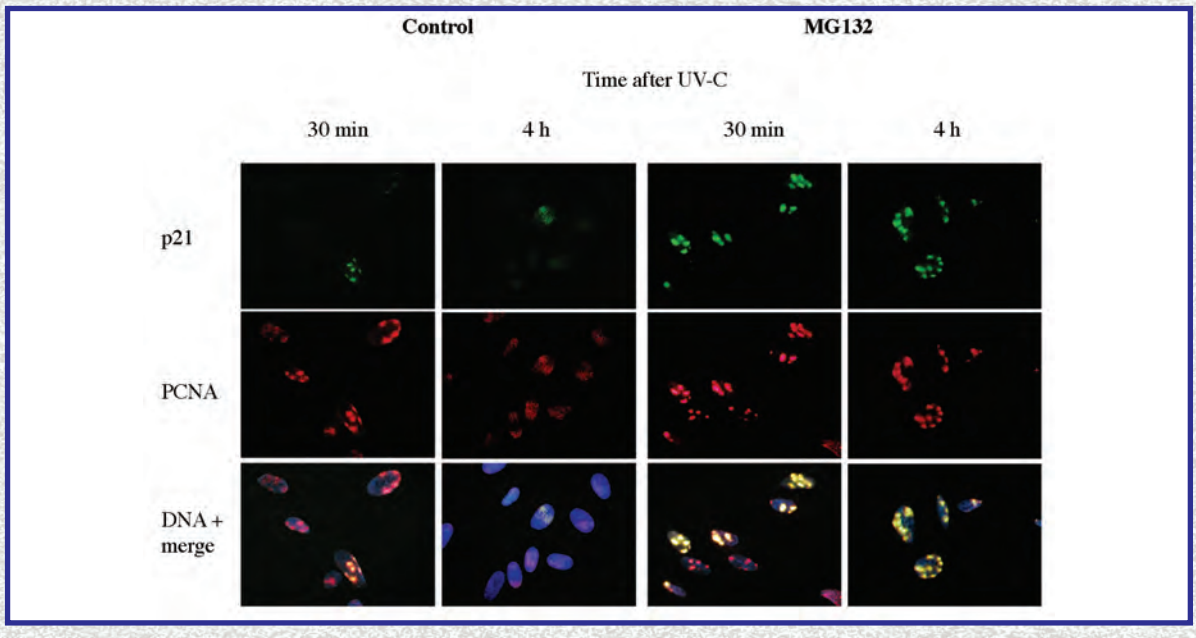
XXX CONFERENZA SCUOLA NAZIONALE DI CITOMETRIA

Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo" 25-28 settembre 2012

Produzione e caratterizzazione di scaffold da muscolo scheletrico: bioattività, istocompatibilità e ottimizzazione per tecniche di ingegneria tissutale

L'inibizione del proteasoma modula i livelli di espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p21^{CDKN1A} in seguito a danno al DNA, senza alterare la risposta apoptotica

News in Bibliografia: flow cytometry and cell cycle, hematology, immunology, nanoparticle toxicology



PARTEC

CyFlow® Sorter

For Cell and Particle Sorting.

reddot design award winner 2012

Highlights CyFlow® Sorter

Simplicity

Sort with ease: as effortless as gating

Now anyone who can operate a flow cytometer can learn to sort in less than 5 minutes.

Affordability

Sorting is no longer cost prohibitive

Partec's patented, innovative sorting technology and efficient design make sorting affordable.

Safety

Take comfort in aerosol-free sorting

Reduce operator risk from biohazardous materials, even without a biosafety hood.

MORE HIGHLIGHTS ...

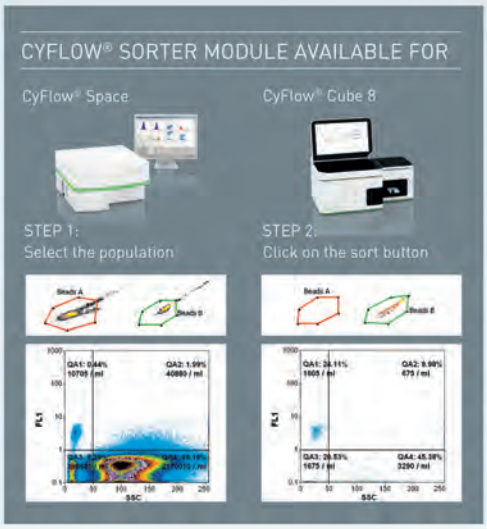
Easiest to use
- Fixed alignment
- No drop-delay to calculate
- No beads to count
- Simply select a population and sort

Safest for biohazardous sorting
- Totally closed fluidic system
- No aerosols
- No droplets
- No high voltage droplet charging

Most affordable
- Robust design for low-maintenance
- Superior price-to-performance ratio

Most gentle
- Ideal for sorting fragile cells
- Low pressure
- Minimal shear forces
- No jet-stream

Unique design in a small footprint
- Fluidic system built-in
- Computer & monitor built-in (only CyFlow® Cube 8)
- Fits easily into a biosafety hood



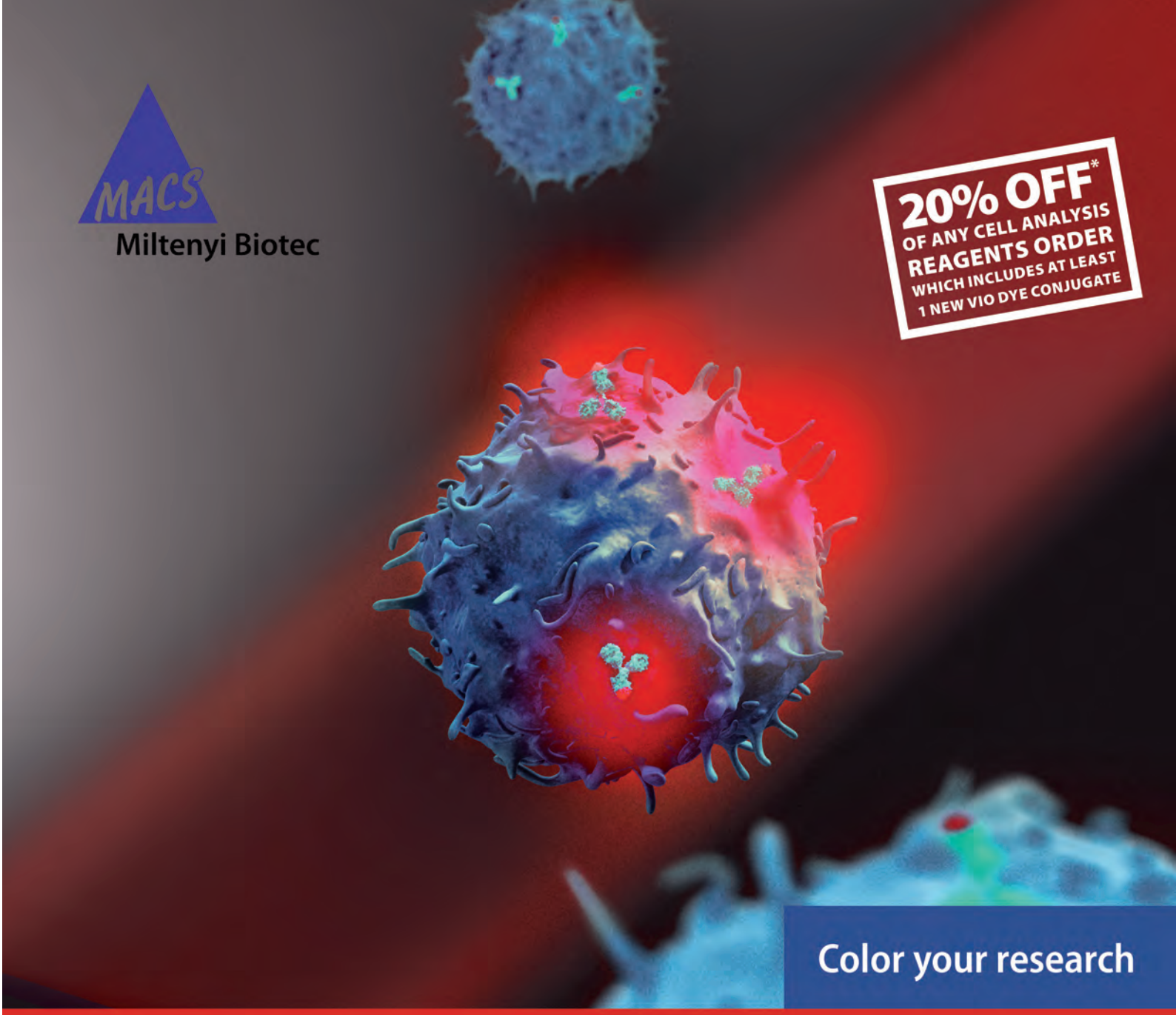
04.12
www.cyclos-design.de

Contact

Partec GmbH | Am Flugplatz 13
D-02828 Görlitz | Germany
Phone +49 3581 8746-0 | Fax +49 3581 8746-70
mail@partec.com

Partec North America, Inc. | 603 Heron Dr.,
Unit 9 | Swedesboro, NJ 08085 | USA
Phone 856 467 0018 | Fax 856 467 0188
partecna@partec.com

Partec has subsidiaries and distributors covering 100 countries worldwide.
Details can be found at the Partec website:
www.partec.com



Vio® Dyes

Expand your marker combinations

Unique – new marker option for violet laser with the VioGreen™ Dye

Impressive – bright tandem performance with APC-Vio770™ and PE-Vio770 Dyes

Flexible – various options for your multicolor applications, for example, with the VioBlue® Dye

Hassle-free – ideal for multicolor experiments due to low compensation requirements

* Expires 12/31/2012. Valid in USA and EU. Cannot be combined with other discounts. Void where prohibited by law or institutional policy. Mention Promo Code: ABNature12 at time of order

Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Persicetana, 2/D | 40012 Calderara di Reno (BO) | Italy
Phone +39 051 6 460 411 | Fax +39 051 6 460 499 | macs@miltenyibiotec.it

Miltenyi Biotec provides products and services worldwide. Visit **www.miltenyibiotec.com/local** to find your nearest Miltenyi Biotec contact.

▶ **macsquant.com/antibodycoupon**

Unless otherwise specifically indicated, Miltenyi Biotec products and services are for research use only and not for therapeutic or diagnostic use. MACS, MACSQuant, Vio, VioBlue, VioGreen, and Vio770 are registered trademarks or trademarks of Miltenyi Biotec GmbH. Copyright © 2012 Miltenyi Biotec GmbH. All rights reserved.

IMMUNOLOGICAL SCIENCES

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRY PANEL

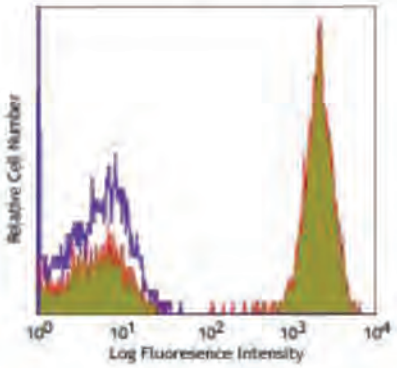
Use our **PerCP Cy5.5** antibodies for hematooncology and immunology!

PerCP –Cy 5.5 blue laser-excitable tandem dye with **emission maximum at 692 nm (far red)**

Recommended for combination with other fluorochromes for blue laser, such as FITC, Alexa Fluor- 488 or PE

PerCP-Cy 5.5 is a relatively bright fluorochrome suitable for less abundant antigens.

There is no spectral overlap into the PE channel, however, cross laser compensation is required in the APC channel



Mouse Anti-Human Monoclonal Antibodies (PerCP Cy5.5)

Cat.#	Antigen	Clone	Host	Isotype	Reactivity	Quantity
MAB-1727PC55	CD3	UCHT1	Ms	IgG1	Hu, Pri	100 tests
MAB-131PCP5	CD4	RPA-T4	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-175PCP5	CD5	CRIS1	Ms	IgG2a	Hu	100 tests
MAB-97PCP5	CD7	MEM-186	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-107PCP5	CD8	MEM-31	Ms	IgG2a	Hu	100 tests
MAB-101PCP5	CD10	MEM-78	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-114PCP5	CD14	61D3	Ms	IgG1	Hu, Pri	100 tests
MAB-918PCP5	CD16	3G8	Ms	IgG1	Hu, Pri	100 tests
MAB-901PCP5	CD19	4G7	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-930PCP5	CD20	2H7	Ms	IgG2b	Hu, Pri	100 tests
MAB-925PCP5	CD25	MEM-181	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-933PCP5	CD33	WM53	Ms	IgG1	Hu, Pri	100 tests
MAB-996PCP5	CD34	581	Ms	IgG1	Hu, Pri	100 tests
MAB-938PCP5	CD38	HIT2	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-142PCP5	CD45	2D1	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB-160PCP5	CD56	MEM-188	Ms	IgG2a	Hu, Pri	100 tests
MAB-963PCP5	CD63	CLB-gran/12	Ms	IgG1	Hu	100 tests
MAB- 926PCP5	CD107a	H4A3	Ms	IgG1	Hu, Pri, Ms	100 tests
MAB-9117PCP5	CD117	104D2	Ms	IgG1	Hu, Pri, Bov	100 tests
MAB-9952PCP5	CD163	GHI/61	Ms	IgG1	Hu, Pri	100 tests

Distributed by:

SIC SOCIETÀ ITALIANA CHIMICI DIVISIONE SCIENTIFICA r.l.

Via Rio nell'Elba 140 - 00138 Rome - ITALY
Phone: +39 06 8818936 / 8800211 Fax: +39 06 8815319
Web-Site: www.sichim.com E-mail: info@sichim.com

Periodico della Società Italiana di Citometria

LETTERE GIC

Vol. 21, Num. 1 Aprile 2012

DIRETTORE RESPONSABILE
Raffaele De Vita

COMITATO EDITORIALE
Marco Danova
Dipartimento di Medicina
A.O. di Pavia
S.C. di Medicina Interna e Oncologia Medica
Ospedale Civile di Vigevano
Raffaele De Vita
Unità Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo
ENEA - Centro Ricerche Casaccia
Roma
Eugenio Erba
Istituto Ricerche Farmacologiche "Mario Negri"
Milano
Giuseppe Starace
Istituto Medicina Sperimentale CNR
Roma

Volume 21, numero 1 Aprile 2012

Lettere GIC
Periodico della Società Italiana di Citometria
Autorizz. del trib. di Roma n° 512/92 del 17/9/92
Edizione quadrimestrale
Spedizione in abbonamento postale

Peer Review Journal

Grafica: Renato Cafieri

Stampa e Pubblicità:

PIGNANI PRINTING
Editorial and Packaging Solution
Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)
Tel. 0761527323 - Fax 0761527323

Redazione:

Società Italiana di Citometria

c/o Unità Biologia delle Radiazioni e
Salute dell'Uomo
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671 Fax 06/30484891
e-mail: devita@enea.it
http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/

Associato alla
Unione Stampa
Periodica Italiana

SOMMARIO

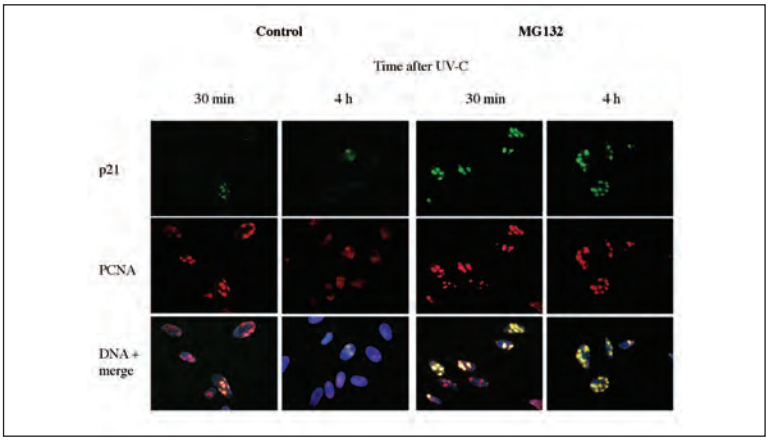
XXX Conferenza Nazionale di Citometria 6
Programma preliminare

Produzione e caratterizzazione di scaffold da muscolo scheletrico: bioattività, istocompatibilità e ottimizzazione per tecniche di ingegneria tissutale 15
A. Costa, B. Perniconi, P. Aulino, L. Teodori, S. Adamo, D. Coletti

L'inibizione del proteasoma modula i livelli di espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p21CDKN1A in seguito a danno al DNA, senza alterare la risposta apoptotica 23
M. Tillhon, I. Dutto, O. Cazzalini, L, A. Stivala, E. Prosperi

News in Bibliografia 28
a cura di *"Marty DV."*

Viaggiando per convegni 31
a cura del "*Viaggiatore*"



In copertina: dal lavoro "L'inibizione del proteasoma modula i livelli di espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p21CDKN1A in seguito a danno al DNA, senza alterare la risposta apoptotica" M. Tillhon, I. Dutto, O. Cazzalini, L, A. Stivala, E. Prosperi. Analisi tramite saggio di immunofluorescenza dei livelli delle proteine p21 e PCNA in fibroblasti primari umani LF-1 dopo trattamento con l'inibitore proteasomiale MG132 (25 μM). L'irraggiamento con radiazione UV-C è stato effettuato utilizzando un filtro di policarbonato che permette di ottenere lesioni localizzate in regioni puntiformi del nucleo e il processamento dei campioni è avvenuto dopo 30 minuti o 4 ore. L'osservazione al microscopio confocale ha permesso di valutare l'accumulo di p21 (fluorescenza verde) e PCNA (fluorescenza rossa) dopo trattamento con MG132 ad entrambi i tempi; la co-localizzazione delle due proteine ai siti di danno è associata al segnale giallo mentre la colorazione con Hoechst 33258 (fluorescenza blu) ha permesso di identificare i nuclei.

Programma Preliminare

Martedì 25 settembre

13.00 Registrazione

14.00 Apertura dei Lavori

SESSIONE PLENARIA comune a tutti i Corsi

SEMINARI INTRODUTTIVI

Le Raccomandazioni per la caratterizzazione citometrica dell'Emoglobinuria Parossistica Notturna
Supported by ALEXION

Nuovi strumenti per l'analisi del processo di immunoricostituzione in pazienti HIV
Supported by BD BIOSCIENCES

Cellule T regolatorie e autoimmunità: focus sul diabete di tipo 1
Supprted by INSTRUMENTATION LABORATORY-BECKMAN COULTER

Fenotipo di cellule mieloidi soppressorie
Supported by MILTENYI BIOTEC

CONCETTI GENERALI DI CITOMETRIA

Citometria a flusso: struttura e principi di funzionamento

Le basi della fluorescenza e le proprietà fondamentali delle molecole fluorescenti

Compensazione delle fluorescenze in citometria a flusso

Docenti: Manuela Battaglia (Milano), Veronica Bordoni (Roma), Rita Casetti (Roma), Raffaella Casotti (Napoli), Luigi Del Vecchio (Napoli), Susanna Mandruzzato (Padova), Giuseppe Starace (Roma), Cesare Usai (Genova)

CORSI "Base" CP

con esercitazioni pratiche

CP1 PROLIFERAZIONE-APOPTOSI-COLTURE CELLULARI

Coordinatori: I. D'Agnano, E. Erba

Mercoledì 26 settembre

Sessione: COLTURE CELLULARI E CICLO CELLULARE

Modelli di studio: colture cellulari, cellule ingegnerizzate, green fluorescent protein, "cell tracking"

Analisi monoparametrica del DNA e del ciclo cellulare: metodologie e applicazioni con presentazione di file citometrici

Esercitazioni pratiche: misure monoparametriche in Citometria a flusso

Sessione: ESERCITAZIONI DI ELABORAZIONE ED ANALISI DEI DATI CITOMETRICI

Elaborazione matematica degli istogrammi di DNA: presentazioni di software e analisi di file citometrici

Tutto quello che dovreste sapere sulla misura biparametrica DNA-BrdU: metodologie e analisi di file citometrici

Giovedì 27 settembre

Sessione: ESERCITAZIONI PRATICHE

Esercitazioni pratiche: misure in citometria a flusso con marcature BrdU

La morte cellulare dal punto di vista molecolare e citometrico: definizione di apoptosi dal punto di vista molecolare e vie di attivazione caspasi dipendente ed indipendente; sub-G1, Annexin V, TUNEL assay, ROS, potenziale mitocondriale, caspasi, bcl-2

Docenti: Flavia Buccella (Urbino), Igea D'Agnano (Roma), Eugenio Erba (Milano), Sergio Marchini (Milano), Nicolò Panini (Milano), Giuseppe Starace (Roma)

CP2 IMMUNOFENOTIPO IN EMATOLOGIA & IMMUNOLOGIA

Coordinatori: B. Canonico, L. Zamai

Mercoledì 26 settembre

Sessione: CONCETTI DI BASE DI STRUMENTAZIONE E PREPARATIVA

Cenni sulla strumentazione per citometria a flusso sia analogica che digitale

Caratteristiche dei principali fluorocromi

Modalità di raccolta, conservazione e trattamento del campione e procedure pre-analitiche: stabilizzanti, lisanti e fissativi

Esercitazioni pratiche di Citometria: utilizzo di biglie fluorescenti su varie piattaforme; marcature su sangue trattato con diversi anticoagulanti; uso di lisanti e fissativi

Sessione: TECNICHE DI MARCATURA E MISURE DI CARATTERIZZAZIONE IMMUNOFENOTIPICA

Anticorpi monoclonali e tecniche di marcatura di superficie e intracitoplasmatica; caratterizzazione immunofenotipica di sangue periferico e cordonale e di linee cellulari emopoietiche

Esercitazioni pratiche di Citometria: acquisizione di campioni di sangue periferico e cordonale e analisi microscopica del campione

Giovedì 27 settembre

Sessione: ELABORAZIONE ED ANALISI DEI DATI CITOMETRICI
Analisi dei file: Boolean gating ed individuazione dei parametri di interesse, cenni su vari software dedicati

Esercitazioni pratiche: analisi di file preselezionati

Docenti: Marcella Arcangeletti (Urbino), Barbara Canonico (Urbino), Laura Galli (Urbino), Loris Zamai (Urbino)

CP3 CITOMETRIA NELLE BIOTECNOLOGIE VEGETALI ED AMBIENTALI
Coordinatori: R.Casotti, R. De Vita, S. Lucretti

Mercoledì 26 settembre

Sessione: TOSSICOLOGIA E AMBIENTE
La citometria a flusso in nanotossicologia
Il test della cometa nello studio del danno al DNA in Tossicologia

Ibridazione in situ Fluorescente (F.I.S.H.), strumento indispensabile nella diagnostica citogenetica

La citometria a flusso negli studi ambientali

Sessione: BIOTECNOLOGIE VEGETALI E MICROBIOLOGIA
Detection e identificazione di batteri mediante l'impiego di anticorpi e sonde oligonucleotidiche in citometria a flusso

Biotecnologie vegetali per produrre nuove piante: un approccio citofluorimetrico

Citogenetica molecolare a flusso: nuove metodiche per l'analisi e la separazione di cromosomi ibridati con sonde fluorescenti

Giovedì 27 settembre

Sessione: ESERCITAZIONI PRATICHE
Esercitazioni pratiche in laboratorio: preparazione di campioni, analisi microscopica dei campioni, misure citometriche, FISH ed il test della cometa

Docenti: Raffaella Casotti (Napoli), Eugenia Cordelli (Roma), Raffaele De Vita (Roma), Debora Giorgi (Roma), Giorgio Leter (Roma), Sergio Lucretti (Roma), Anita Manti (Urbino), Mauro Nanni (Roma)

CP4 STRUMENTI E METODOLOGIE IN CITOMETRIA E MICROSCOPIA
Coordinatori: G. Mazzini, C. Usai

Mercoledì 26 settembre

Sessione: MICROSCOPIA OTTICA IN FLUORESCENZA
Dal microscopio ottico normale alla microscopia in fluorescenza: principi di microscopia ottica fluorescenza e fluorocromi

Esercitazioni pratiche di microscopia: allestimento e osservazione di campioni citologici "colorati" ed in "fluorescenza"

Sessione: CITOMETRIA A FLUSSO
Dal microscopio al citometro a flusso: struttura e funzionamento dei citometri a flusso basati su laser e su lampada

Esercitazioni pratiche di citometria: metodiche di fissazione e di colorazione di DNA e proteine, immunomarcature; allestimento e analisi di campioni

Giovedì 27 settembre

Sessione: MICROSCOPIA E CITOMETRIA APPLICATA

Microscopia confocale ed altre microscopie "avanzate": principi di funzionamento della microscopia confocale. Cenni alle microscopie avanzate; esempi pratici di utilizzo

Citometria applicata: analisi del DNA in colture sperimentali ed in campioni clinici; analisi multiparametrica: problemi metodologici e strumentali

Docenti: Erica Cesarini (Urbino), Eugenio Erba (Milano), Giuliano Mazzini (Pavia), Cesare Usai (Genova)

CORSI "Avanzati" CA

CA1 EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE

Coordinatori: M. Della Porta, L. Del Vecchio

Mercoledì 26 settembre

Sessione: ANALISI IMMUNOFENOTIPICA DELLE LEUCEMIE E DELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE

Avanzamenti e controversie nell'analisi immunofenotipica delle leucemie acute mieloidi

Presentazione di casi clinici con files citometrici

Integrazione di parametri morfologici immunofenotipici e molecolari nella diagnosi e nella prognosi delle sindromi mielodisplastiche

Presentazione di casi clinici con files citometrici

Sessione: LEUCEMIA LINFATICA CRONICA E MIELOMA MULTIPLO

Linfocitosi B monoclonale (MBL) e leucemia linfatica cronica

Presentazione di casi clinici con files citometrici

Utilità clinica e significato prognostico della citometria a flusso multiparametrica nel mieloma multiplo

Presentazione di casi clinici con files citometrici

Giovedì 27 settembre

Sessione: BIOPSIE LINFONODALI E CELLULE ENDOTELIALI CIRCOLANTI

La citometria a flusso per l'analisi immunofenotipica di biopsie linfonodali

Presentazione di casi clinici con files citometrici

Nuove metodiche per la standardizzazione del conteggio delle cellule endoteliali circolanti in citometria a flusso

Presentazione di casi clinici con files citometrici

Docenti: Luigi Del Vecchio (Napoli), Matteo Della Porta (Pavia), Paolo Ghia (Milano), Patrizia Mancuso (Milano), Bruno Paiva (Salamanca), Alessandra Stacchini (Torino)

CA2 LA CITOMETRIA NEGLI AVANZAMENTI DELL'IMMUNOLOGIA

Coordinatori: D. Fenoglio. L. Zamai

Mercoledì 26 settembre

Sessione: ALCUNI ASPETTI POCO CONOSCIUTI DELLA BIOLOGIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Th17 cells: in salute e malattia

I linfociti T gammadelta, effettori che collegano l'immunità innata e acquisita

Le cellule NK: attività citotossica e differenziamento (con dimostrazioni di file citometrici)

Nuovi aspetti della comunicazione cellulare: un possibile legame tra la comunicazione cellulare e il pathway apoptotico in cellule T

Sessione: CIRCUITI IMMUNOREGOLATORI

Standardizzazione della valutazione fenotipica e funzionale delle popolazioni T regolatorie (con dimostrazioni di file citometrici)

Immunomodulazione e mesenchimali

Sessione: IL SISTEMA IMMUNITARIO CONTRO TUMORI E VIRUS E VICEVERSA: UN GIOCO A SCACCHI

La citometria in oncologia clinica con particolare riguardo alle target therapies di natura immunologica

Standardizzazione dei protocolli di valutazione del follow-up immunologico nell'immunoterapia dei tumori

Giovedì 27 settembre

Sessione: LA CITOMETRIA NELL'INFEZIONE DA HIV E LA PERSONALIZZAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Immunoattivazione ed immunoregolazione nella malattia da HIV

Citomica multiparametrica e polifunzionale nello studio dell'infezione da HIV

I Linfociti T GAMMADELTA TH1/TH17 sono espansi nei pazienti HIV-1 e rispondono alla Candida Albicans

Come le NK influenzano alcune patologie: tumori, infezioni ed autoimmunità

Docenti: Andrea Cossarizza (Modena), Andrea Fattorossi (Roma), Daniela Fenoglio (Genova), Francesca Luchetti (Urbino), Alessandro Poggi (Genova), Loris Zamai (Urbino), Maria Raffaella Zocchi (Genova)

CA3 ONCOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE

Coordinatori: M. Danova, G. Pirozzi

Mercoledì 26 settembre

Sessione: CITOMETRIA E FISH IN ONCOLOGIA

Evoluzione del ruolo della Citometria in Oncologia: applicazioni emergenti nello studio della biologia dei tumori solidi

Dall'analisi del DNA allo studio degli eventi rari ed al "sorting"

L'applicazione della FISH in Oncologia

Analisi DNA o DNA/BrDU: studi con linee cellulari e con modelli animali

Presentazione di file sperimentali con misure di Fase S/Apoptosi e approfondimenti su modellistica di analisi

Sessione: CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI E "CANCER STEM CELLS"
Cellule Tumorali Circolanti: analisi ed implicazioni cliniche

"Cancer Stem Cells": analisi ed implicazioni cliniche

Giovedì 27 settembre

Sessione: INVASIONE, METASTATIZZAZIONE E TERAPIE
"Cell and Gene Therapy" in Oncoematologia Pediatrica
Invasione e Metastatizzazione

Discussione sulle sinergie tra i diversi approcci di studio e ricerca traslazionale

Docenti: Ettore Biagi (Monza), Marco Danova (Vigevano), Eugenio Erba (Milano), Renato Franco (Napoli), Giuseppe Pirozzi (Napoli), Virginia Tirino (Napoli)

CONFERENZA NAZIONALE DI AGGIORNAMENTO

NUOVE METODOLOGIE ANALITICHE IN EMATOLOGIA, IMMUNOLOGIA E ONCOLOGIA

Coordinatori: G. Gaipa, S. Papa

Giovedì 27 settembre

Immunofenotipizzazione delle leucemie acute in citometria a flusso: indirizzi metodologici e valore clinico

Standardizzazione delle metodiche di valutazione delle cellule endoteliali circolanti e dei progenitori endoteliali circolanti tramite analisi citofluorimetrica

Il microambiente tumorale: meccanismi di immunoevasione

Telomerasi, quale target della cancer immunotherapy

Venerdì 28 settembre

Recettori chimerici come nuova prospettiva di cura delle leucemie

Mieloma multiplo: progressi nelle acquisizioni biologiche e nuove terapie

Potenziali implicazioni terapeutiche delle cellule staminali tumorali

Percorsi di Qualità in Citometria

Qualifica di Citometrista: percorso di formazione e certificazione

Relatori: Ettore Biagi (Monza), Rosa Chianese (Ivrea), Raffaele De Vita (Roma), Matteo Della Porta (Pavia), Daniela Fenoglio (Genova), Giuseppe Gaipa (Monza), Francesco Lanza (Cremona), Giuliano Mazzini (Pavia), Bruno Paiva (Salamanca), Stefano Papa (Urbino), Alessandro Poggi (Genova), Lucia Ricci Vitiani (Roma)

Accreditamento E.C.M. per Corsi e Conferenza:
Biologo, Medico, Chimico, Farmacista, Veterinario, Tecnico Sanitario Laboratorio Biomedico

QUOTE DI ISCRIZIONE

Corso e Conferenza		dopo il 31 maggio
Soci GIC	€ 350,00	€ 390,00
Non Soci GIC	€ 390,00	€ 430,00
Non strutt. Soci GIC	€ 230,00	€ 270,00

Conferenza		dopo il 31 maggio
Soci GIC	€ 120,00	€ 140,00
Non Soci GIC	€ 150,00	€ 170,00
Non strutt. Soci GIC	€ 100,00	€ 120,00

+ Crediti Formativi ECM	€ 30,00*
+ Corso ECM FAD	€ 40,00**

*I Partecipanti che richiedono i crediti ECM sono tenuti a versare un contributo spese di € 30,00

**Con una integrazione di € 40,00 è possibile iscriversi al Corso FAD "La Citometria nella Biologia e nella Clinica" accreditato ECM con 25 crediti per Biologo, Medico, Chimico, Farmacista, Tecnico S.L.B. e Veterinario

"Le quote sono da intendersi IVA esclusa"

Qualifica di Citometrista
La partecipazione ai Corsi ed alla Conferenza permetteranno di ottenere Crediti Formativi GIC utili per il processo di acquisizione della "Qualifica di Citometrista" insieme ad altri requisiti, in alcuni ambiti di particolare rilevanza applicativa della Citometria.

I "non strutturati" (Tesisti, Borsisti etc. max 35 anni) per poter usufruire della quota ridotta dovranno inviare, insieme alla scheda di iscrizione, un'autocertificazione vistata dal responsabile della struttura di appartenenza, che attesti la posizione del richiedente. Le schede per la partecipazione ai Corsi e alla Conferenza possono essere scaricate dal sito GIC: http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/

I Corsi sono a numero chiuso e si svolgono in parallelo; gli iscritti riceveranno materiale didattico nella forma di file contenuti in una pendrive.

Nell'ambito della Conferenza è prevista l'annuale Assemblea della Società Italiana di Citometria GIC, la consegna dei Premi di Studio GIC e la presentazione di materiale e di apparecchiature da parte delle principali Aziende del settore.

Segreteria Scientifica
Società Italiana di Citometria
c/o Unità Biologia delle Radiazioni e Salute dell'Uomo
ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma
tel. 06 30484671 - fax 06 30484891
e-mail: devita@enea.it
http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/

Segreteria Campus Urbino
Dott.ssa Elisabetta Fucili
tel.: 0722 304279 fax: 0722 304243
e-mail: elisabetta.fucili@uniurb.it

Segreteria Organizzativa
Italymeeting s.r.l.
Via Parsano, 6/b - 80067 Sorrento NA
tel. 081 8073525 - 081 8784606 fax 081 8071930
e-mail: citometriaGIC@italymeeting.it
http://www.italymeeting.it

in collaborazione
con il Centro di Citometria Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

con il Patrocinio di:
Presidenza del Consiglio dei Ministri
Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"
ENEA Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile
CNR Consiglio Nazionale delle Ricerche
Ordine Nazionale dei Biologi
Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri"
Istituto Nazionale Tumori "Fondazione G. Pascale"
Stazione Zoologica "Anton Dohrn"
Comune di Urbino
Provincia di Pesaro e Urbino
Regione Marche
E.R.S.U. Urbino

PROGRAMMA SOCIALE
Preliminare

Martedì 25 settembre
11.00 Visita al Palazzo Ducale di Urbino*
13.00 Registrazione con Caffè
18.30 Brindisi di Benvenuto

Mercoledì 26 settembre
18.00 Visita alla Casa di Raffaello*
20.30 Cena Sociale GIC

Giovedì 27 settembre
17.30 Assemblea dei Soci
☺ Omaggio ai Soci in regola per quota 2013
18.30 Aperitivo "Sapere i Sapori … a Km 0"

Venerdì 28 settembre
12.45 Sorteggio Premi scheda valutazione evento
13.00 Colazione Speciale di saluto*
15.00 Visita Museo della Città di Urbino "Palazzo Odasi"*
16.00 Visita Oratorio di San Giovanni Battista*

* Per gli eventi contrassegnati è indispensabile la prenotazione alla Segreteria GIC con un messaggio e-mail o fax entro il 10 settembre 2012.

Dako

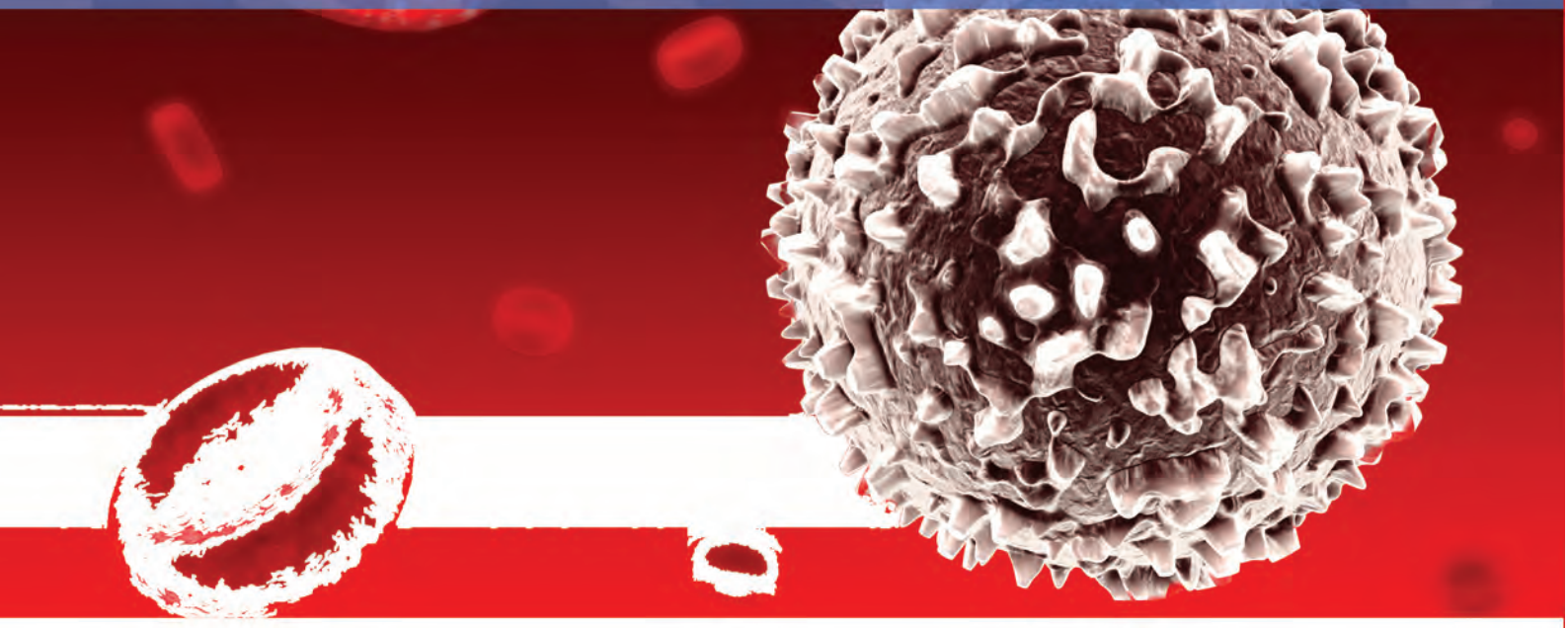
THE SHAPE OF EXCELLENT
LABORATORY PERFORMANCE

Kappa & Lambda | Assessment of B-cell monoclonality

KNOW...

Dako's Kappa and Lambda reagents:

... Render **fast and unambiguous** results
... Provide exceptional **bright signals**
... Show **excellent signal to noise** ratio



Dako Italia S.p.A.
Via Piero Portaluppi, 11/2
I-20138 Milano

KNOW Dako

Produzione e caratterizzazione di scaffold da muscolo scheletrico: bioattività, istocompatibilità e ottimizzazione per tecniche di ingegneria tissutale

Alessandra Costa[1,3], Barbara Perniconi[2,4], Paola Aulino[2], Laura Teodori[3], Sergio Adamo[2], Dario Coletti[2,4]

[1]Università di Roma Tor Vergata, 00133 Roma, Italia
[2]Università di Roma La Sapienza, Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico-legali e dell'Apparato Locomotore, Sezione Istologia ed Embriologia Medica, 00161 Roma, Italia
[3]Laboratorio di Diagnostica e Metrologia, UTAPRAD-DIM, ENEA-Frascati, 00044 Roma, Italia
[4]UPMC Univ Paris 6 – UR4, F-75005 Paris, France

e-mail: alessandra.costa@uniroma1.it

Abstract

La sostituzione di tessuto muscolare con tessuto muscolare ingegnerizzato scheletrico può rappresentare un intervento terapeutico utile in caso di danno o miopatia. A tale scopo si richiede tessuto muscolare scheletrico altamente orientato, vascolarizzato e funzionale. Tra i biomateriali per l'ingegneria tissutale sono ampiamente utilizzati gli *scaffold* derivanti dalla decellularizzazione di organi interi. Noi abbiamo prodotto *scaffold* da tessuto muscolare scheletrico murino decellularizzato. Questo mantiene sia le caratteristiche chimiche sia la struttura tridimensionale del tessuto di origine, caratteristiche conservate durante un periodo di stoccaggio pre-impianto e responsabili della sua bioattività *in vivo*: in particolare, abbiamo dimostrato che lo *scaffold* è *per se* un ambiente pro-miogenico in grado di supportare la formazione di nuove fibre muscolari.

Introduzione

La principale caratteristica dei biomateriali consiste nell'interazione con le componenti biologiche dell'ospite [1]. Molte strategie sono state adottate per produrre biomateriali per applicazioni di ingegneria tissutale, tra queste la produzione di costrutti derivanti da tessuto decellularizzato successivamente ripopolato con cellule di varia natura. Questi sono utilizzati soprattutto per la sostituzione di quei tessuti o organi la cui composizione chimica e organizzazione spaziale sono complesse. La decellularizzazione di un tessuto elimina la componente cellulare e preserva la matrice extracellulare (ECM) [2]. L'ECM è per definizione un biomateriale ideale in quanto è sintetizzato da cellule residenti nel tessuto ed è quindi biocompatibile [3]. Uno dei principali ostacoli all'ingegneria tissutale del muscolo scheletrico è l'organizzazione altamente ordinata e gerarchica delle fibre muscolari. Per superare questo problema sono utilizzate aree di matrice muscolare acellulare autologa in cui sono stati coltivati dei mioblasti [4], oppure cellule miogeniche su matrici fibrillari [5]. Sebbene la generazione di un cuore bioingegnerizzato funzionale ha dimostrato che è possibile produrre in vitro un intero organo dalla struttura complessa [6], non è stato ancora prodotto tessuto muscolare scheletrico anatomicamente definito e trapiantabile. A questo scopo abbiamo generato uno *scaffold* acellulare derivante da muscolo scheletrico e lo abbiamo trapiantato in un ospite singenico in un modello murino. Questo approccio ci ha permesso un'ampia caratterizzazione dell'istocompatibilità, della bioattività e dell'integrazione in vivo dello *scaffold*.

Materiali e Metodi

Animali

Negli esperimenti di trapianto sono stati utilizzati topi BALB/C adulti dello stesso sesso. Per esperimenti specifici sono stati utilizzati anche topi Nude adulti (ceppo NU/NU Crl:NUFoxn1nu, Charles River, Milano, Italia). Gli animali sono stati trattati secondo le linee guida del Comitato Guida istituzionale per la sperimentazione animale. I topi donatori sono stati sacrificati prima della rimozione del muscolo, mentre i topi riceventi sono stati anestetizzati prima del trapianto.

Decellularizzazione del muscolo scheletrico

Recentemente è stato dimostrato che l'incubazione in una soluzione di 1% SDS è in grado di rimuovere completamente la componente cellulare di un cuore di ratto [6]. Per la decellularizzazione, quindi i muscoli *Tibialis anterior* (TA) ed *Extensor digitorum longus* (EDL) sono stati dissezioni ed immediatamente incubati in una soluzione di 1% SDS in acqua bidistillata (circa 10 ml per due muscoli) per 24 e 48 ore, rispettivamente, a temperatura ambiente in rotazione. Alla fine della decellularizzazione i muscoli sono stati lavati per tre volte per 30 min in PBS sterile. Gli *scaffold* decellularizzati sono stati utilizzati direttamente oppure conservati per specifici esperimenti.

Procedura di trapianto

Gli *scaffold* di muscolo TA sono stati trapiantati al posto

Pure Quality

La perfezione nella qualità—Eppendorf Tissue Culture Consumable

Eppendorf supporta i ricercatori di tutto il mondo con prodotti di qualità particolarmente elevata per la coltura, l'analisi e la conservazione di cellule. L'esperienza e la qualità riconosciuta di Eppendorf in una nuova linea di prodotto: Eppendorf Tissue Culture Consumable.

> Agevola il tuo lavoro giornaliero con lo speciale design del consumabile che ti permette una presa sicura e un consistente impilamento
> Assicura le migliori condizioni di crescita per le tue cellule e la minima variazione sperimentale con superfici omogenee e geometria costruttiva avanzata che garantiscono uno scambio gassoso e di temperatura ottimali

eppendorf

Ottimizza il tuo lavoro nel laboratorio di colture cellulari usando la nuova Easypet 3:

> Controlla la velocità di pipettaggio in modo opportuno ed intuitivo con la punta delle dita
> Sperimenta un pipettaggio senza fatica con la leggera, ergonomica e ben bilanciata Easypet 3
> Affronta con tranquillità anche il lavoro più intenso e prolungato avendo sempre il controllo visivo della batteria residua

www.eppendorf.it/tcc · eppendorf@eppendorf.it

eppendorf® e easypet® sono marchi registrati di Eppendorf AG, Amburgo, Germania.
Tutti i diritti riservati, grafica e immagini comprese. Copyright © 2012 Eppendorf AG.

del muscolo omologo in un animale ricevente singenico, tranne dove diversamente specificato. Dopo aver anestetizzato gli animali con Avertina A (tribromoetanolo e 2-metilbutanolo, Sigma, St Louis, MO, USA), ed aver sterilizzato l'area interessata, è stata effettuata un'incisione nel derma, prestando particolare attenzione all'integrità dell'epimisio. Il tendine distale e un terzo del muscolo prossimale sono stati lasciati in situ come supporto per la sutura dello *scaffold*. Lo *scaffold* è stato suturato secondo l'orientamento originario del muscolo con punti di seta (USP 5-0 TR-17 black silk 45 cm). Infine sono stati suturati sia l'epimisio che la pelle. I costrutti trapiantati sono stati successivamente dissezionati a una, due tre o quattro settimane dal trapianto.

Analisi istologica

Il muscolo TA dissezionato è stato immerso nel mezzo di congelamento (Leica, Wetzlar, Germania) e congelato in isopentano raffreddato in azoto liquido. Le criosezioni trasversali (8 μm, se non diversamente specificato) sono state ottenute dalla parte centrale del campione utilizzando un criotomo Leica. Per l'analisi istologica le criosezioni sono state colorate con il metodo standard per ematossilina-eosina. Le immagini sono state acquisite con il sistema Axioscop2 plus equipaggiato system con Axiocam HRc (Zeiss, Oberkochen, Germania) ad una risoluzione di 1300X1030 pixel.

Immunofluorescenza

Criosezioni trasversali sono state fissate in 4% paraformaldeide per 10 min. Dopo l'incubazione con 1% BSA (Sigma) per 30 min, sono state incubate con anticorpi rabbit-anti-laminina (1:100) o falloidina (1:500) in 1% BSA, e successivamente con 0.5 ug/ml Hoechst 33342 (Sigma). Un protocollo con un passaggio di permeabilizzazione della membrana plasmatica con 0,5% di Triton X 100 è stato necessario per l'incubazione con gli anticorpi Sigma mouse-anti-MHC (Myosin Heavy Chain) e rabbit-anti-sarcoglicano β diluiti rispettivamente 1:200 e 1:50 in goat serum. Dopo numerosi lavaggi in PBS le criosezioni sono state incubate con gli appropriati anticorpi secondari diluiti 1:500 in 1% BSA coniugati ai fluorocromi verdi (Alexa 488) o rossi (Alexa 568).

Un'aliquota di 25.000 cellule dagli esperimenti di citofluorimetria è stata citocentrifugata per analizzare l'espressione di PW1 [7, 8]. Abbiamo utilizzato un anticorpo anti-PW1 diluito a 1:2000 in 1% BSA, seguito da incubazione con anticorpo secondario Alexa 568 diluito 1:500 in 1% BSA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Per il controllo negativo è stato utilizzato siero pre-immune. L'Hoechst è stato utilizzato per evidenziare i nuclei. Le immagini sono state acquisite con il sistema Axioscop2 plus equipaggiato system con Axiocam HRc (Zeiss, Oberkochen, Germania) ad una risoluzione di 1300X1030 pixel.

Analisi citofluorimetrica

Un costrutto trapiantato, un muscolo controlaterale ed un muscolo normale sono stati dissezionati e digeriti in una soluzione di 50 U/ml di collagenasi di tipo II (Sigma), 35 U/ml di ialuronidasi di tipo IV (Sigma) e 1 mg/ml di collagenasi/dispasi in PBS [9]. Dopo l'aggiunta di siero, la soluzione è stata filtrata in un filtro da 40 μm, centrifugata e risospesa in PBS. Le cellule sono state fissate in 2% paraformaldeide per 10 min, incubate con 1% BSA per 30 min, e successivamente con gli anticorpi monoclonali anti-CD45 coniugato a PE-Cy5 o a un anticorpo monoclonale anti-Sca-1coniugato FITC, diluiti 1:100 in 0.1% BSA per 30 min, a temperatura ambiente (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Altri anticorpi utilizzati in questa analisi (tutti alla concentrazione di 0,025 μg/μl) sono gli anticorpi policlonale di ratto anti-topo M3/84 Mac-3, Rb6-8C5 Gr-1 e CD3 (BD Bioscience). Per distinguere le cellule dai residui di ECM abbiamo marcato le cellule con una soluzione 50 mg/ml di Ioduro di Propidio (PI). Le cellule sono state analizzate con un citofluorimetro Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Sono stati registrati 100,000 eventi ed i dati sono stati analizzati con il software Summit (Beckman Coulter). Le cellule marcate con PI sono state selezionate e il segnale rappresentato come valore biparametrico di *forward scatter* (FSC) contro *side scatter* (SSC). Dopo aver settato il bianco, cellule CD45 o Sca-1 positive sono state selezionate e rappresentate in forma di dot plot. Per ogni campione 20,000 eventi sono stati analizzati.

Risultati

Caratterizzazione istologica ed istochimica di *scaffold* derivanti da muscolo scheletrico

I muscoli dissezionati sono stati immediatamente sottoposti a decellularizzazione. Dopo l'incubazione in SDS i muscoli appaiono trasparenti e leggermente dilatati (Fig. 1A). Attraverso esperimenti preliminari abbiamo fissato il tempo minimo necessario per una completa decellularizzazione: 24 ore per l'EDL e 48 ore per il TA (Fig. 1B). Per i successivi esperimenti l'analisi si è concentrata sul TA. La colorazione ematossilina-eosina del muscolo decellularizzato mostra un network filamentoso debolmente colorato in rosa, mentre i nuclei sono totalmente assenti. L'esclusiva presenza dei componenti della ECM è ulteriormente confermata dall'immunofluorescenza per laminina, che conserva la tipica organizzazione poligonale della lamina basale che circonda le fibre muscolari (Fig. 1C pannelli inf.). La completa assenza della componente miofibrillare e dei nuclei è dimostrata nell'immunofluorescenza per actina e nuclei in cui si osserva la completa scomparsa di questi elementi cellulari (Fig. 1C pannelli sup.). Poiché uno dei maggiori obiettivi dell'ingegneria tissutale è la produzione di materiali conservabili, abbiamo studiato la conservazione degli *scaffold* nel tempo. Gli *scaffold* sono conservabili per due settimane

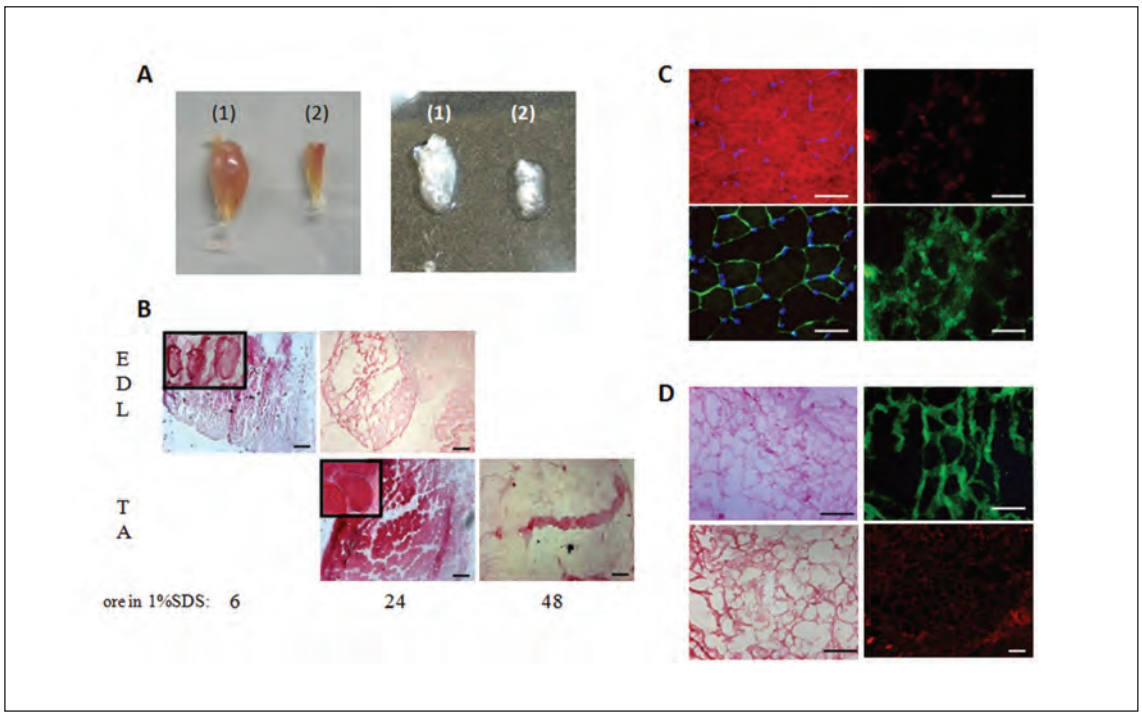


Fig. 1: Decellularizzazione del muscolo scheletrico. A) Muscoli TA ed EDL (1 e 2) prima (pannello di sinistra) e dopo (pannello di destra) la decellularizzazione in 1% SDS dopo 48 ore (1) e 24 ore (2). **B)** *Time course* di decellularizzazione in sezione trasversale, colorazione ematossilina-eosina dei muscoli EDL (pannelli sup.) e TA (pannelli inf.). **C)** Immunofluorescenza per actina in rosso (pannelli sup.) e laminina in verde (pannelli inf.) in sezioni trasversali di muscolo TA (pannelli di sinistra) e di *scaffold* (pannelli di destra). I nuclei sono marcati in blu con Hoechst. **Conservazione dello *scaffold*. D)** Nei pannelli di sinistra colorazioni ematossilina-eosina, nei pannelli di destra immunofluorescenza per laminina in verde o rosso su sezioni trasversali di *scaffold* derivanti da muscoli TA. I nuclei sono stati colorati con Hoechst. Barra = 50 micron.

in condizioni sterili sia a +4 °C in PBS (Fig. 1D pannelli sup.) sia a +37 °C, 5% CO2, in DMEM (Fig. 1D pannelli inf.): dopo questo tempo infatti è ancora rilevabile il segnale della laminina che mantiene anche la sua struttura tridimensionale. Quindi lo *scaffold* può essere conservato non solo a basse temperature, ma anche in condizioni adatte alla coltura cellulare.

Risposta infiammatoria allo *scaffold*

Allo scopo di analizzare la bioattività dello *scaffold*, abbiamo eseguito esperimenti di trapianto ortotopico. I costrutti trapiantati sono stati analizzati a diversi tempi: una, due, tre e quattro settimane dal trapianto. Dall'analisi per immunofluorescenza del costrutti a due settimane è evidente che questo è stato invaso da moltissime cellule che ricoprono lo spazio intorno e dentro la lamina basale (Fig. 2A). Inoltre la presenza delle immunoglobuline evidenzia una forte infiammazione (Fig. 2A). Per chiarire la natura di queste cellule infiltranti, abbiamo eseguito un'analisi citofluorimetrica per CD45 (Fig. 2B). Le cellule esprimenti CD45 sono molto abbondanti nel costrutto trapiantato, in netto contrasto con la percentuale delle stesse cellule nel muscolo controlaterale, comparabile alla percentuale del muscolo normale (Fig. 2B). Questo indica che nel costrutto trapiantato è presente una popolazione di cellule leucocitiche, assente nel muscolo contro laterale, e quindi l'infiammazione non è sistemica, ma ristretta al sito del trapianto. Abbiamo inoltre approfondito la natura delle cellule mononucleate CD45 positive attraverso un'analisi citofluorimetrica della co-espressione di CD3 per identificare i linfociti, Gr-1 per i granulociti e Mac-3 per i macrofagi. Come mostra la Tabella1, la percentuale relativa di cellule CD45 positive nel muscolo controlaterale e nello *scaffold* trapiantato è paragonabile, tuttavia quest'ultimo presenta una percentuale maggiore di granulociti ($CD45^+/Gr\text{-}1^+$) sia a due sia a quattro settimane dal trapianto. Muscoli che hanno subito danno vanno incontro a un processo infiammatorio seguito da rigenerazione mediata da cellule staminali miogeniche, portando infine alla formazione di nuove fibre muscolari. In accordo, abbiamo individuato due popolazioni di cellule presentanti Sca-1 (stem cell antigen 1) nel costrutto trapiantato a due settimane dal trapianto (Fig. 2C). La sotto-popolazione di cellule Sca-1+ con i valori più bassi di FSC e SSC è presente anche nel muscolo controlaterale e nel muscolo normale (Fig. 2C). Sca-1 è un antigene aspecifico per la staminalità e nel muscolo scheletrico è co-espresso con PW1/Peg3. PW1 è stato recentemente identificato come un marcatore specifico per cellule staminali interstiziali, che prendono il nome di PICs [7,8]. La presenza di PICs nello *scaffold* trapiantato è stata confermata dall'espressione di PW1 [7] in citocentrifugati (Fig. 2D).

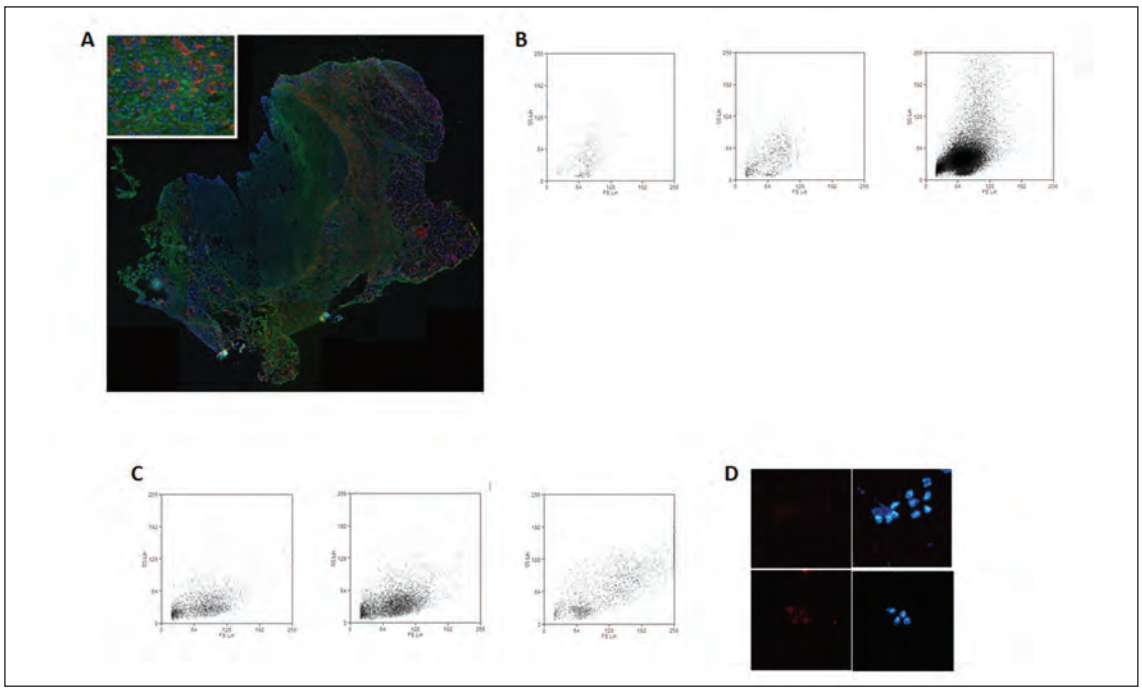


Fig. 2: Interazione *scaffold*-ospite. A) Immunofluorescenza per laminina in rosso ed Ig in verde su sezione trasversale centrale (ricostruzione fotografica) di *scaffold* derivante da muscolo TA dopo due settimane dal trapianto. I nuclei sono colorati con Hoechst in blu. **B** e **C)** Analisi al citofluorimetro del segnale SSC in funzione del segnale FSC per cellule $CD45^+$ (pannelli sup.) o $Sca\text{-}1^+$ (pannelli inf.) in (da sinistra a destra) muscolo TA normale, muscolo TA controlaterale e *scaffold* analizzato dopo 2 settimane dal trapianto. **D)** Immunofluorescenza per PW1 (rosso)/ nuclei (blu) su citocentrifugati di muscolo sano (pannelli sup.) e *scaffold* derivante da muscolo TA, analizzato a due settimane dal trapianto (pannelli inf.).

Potenziale miogenico dello *scaffold*

L'analisi morfologica del costrutto trapiantato a una settimana dal trapianto rivela la presenza di miofibre nascenti disperse nella popolazione di cellule infiammatorie (Fig. 3A). Queste fibre muscolari variano in dimensioni, mostrano un abbondante citoplasma eosinofilo e un nucleo centrale, caratteristiche distintive delle fibre muscolari rigeneranti. Queste fibre rigeneranti sono posizionate lontane dal muscolo dell'animale ospite sia in senso radiale che longitudinale (Fig. 3A). Anche a due settimane dal trapianto il costrutto trapiantato presenta fibre muscolari di nuova formazione (dati non mostrati). Poiché il costrutto trapiantato è invaso da cellule leucocitiche, abbiamo deciso di trapiantare gli *scaffold* in topi atimici. La presenza di fibre muscolari rigeneranti è confermata anche nei topi atimici a due settimane dal trapianto, sia a livello morfologico che molecolare (Fig. 3B e C). In particolare l'espressione di markers del differenziamento tardivo del muscolo scheletrico, come la MHC, dimostrano la presenza di tessuto muscolare scheletrico di nuova formazione, inoltre il numero delle fibre rigeneranti non appare significativamente alterato negli animali immuno-depressi (Fig. 3C).

Discussione e Conclusioni

Crescente interesse si sta sviluppando per l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa, due discipline che hanno come obiettivi il ripristino o la sostituzione di tessuti o organi danneggiati attraverso l'utilizzo di cellule staminali e biomateriali [11]. Un approccio ampiamente utilizzato prevede la coltivazione di cellule sia autologhe sia eterologhe in uno *scaffold* biocompatibile dalla struttura tridimensionale porosa, insieme ad appropriati fattori di crescita. Lo *scaffold* fornisce il supporto per l'adesione cellulare, la proliferazione ed il differenziamento, inoltre mima le caratteristiche strutturali e funzionali della ECM, che ha un ruolo fondamentale nel controllo e nella regolazione del comportamento cellulare [12]. I risultati finora ottenuti nell'ingegneria tissutale del muscolo scheletrico sono lontani da quelli ottenuti per altri tessuti o organi a causa dell'intrinseca complessità di questo tessuto. I maggiori ostacoli nella costruzione di tessuto muscolare ingegnerizzato sono: l'abbondanza del tessuto, che rappresenta circa il 40% della massa corporea; la sua complessa organizzazione gerarchica e tridimensionale; la vascolarizzazione capillare; l'innervazione per la funzionalità; le connessioni tendinee. Noi crediamo che uno *scaffold* derivante da tessuto muscolare decellularizzato sia un approccio razionale per il superamento di queste problematiche. I metodi utilizzati precedentemente per decellularizzare il muscolo scheletrico erano basati su una lunga serie di digestioni enzimatiche e trattamenti detergenti [13], mentre il metodo messo appunto da noi è più semplice, veloce e garantisce la sterilità. Inoltre gli *scaffold* ottenuti possono essere conservati per qualche settimana sia a +4 °C che a +37 °C. Coniugare l'istocompatibilità con la disponibilità del materiale di partenza è una delle principali sfide degli interventi di medicina rigenerativa basati sul trapianto.

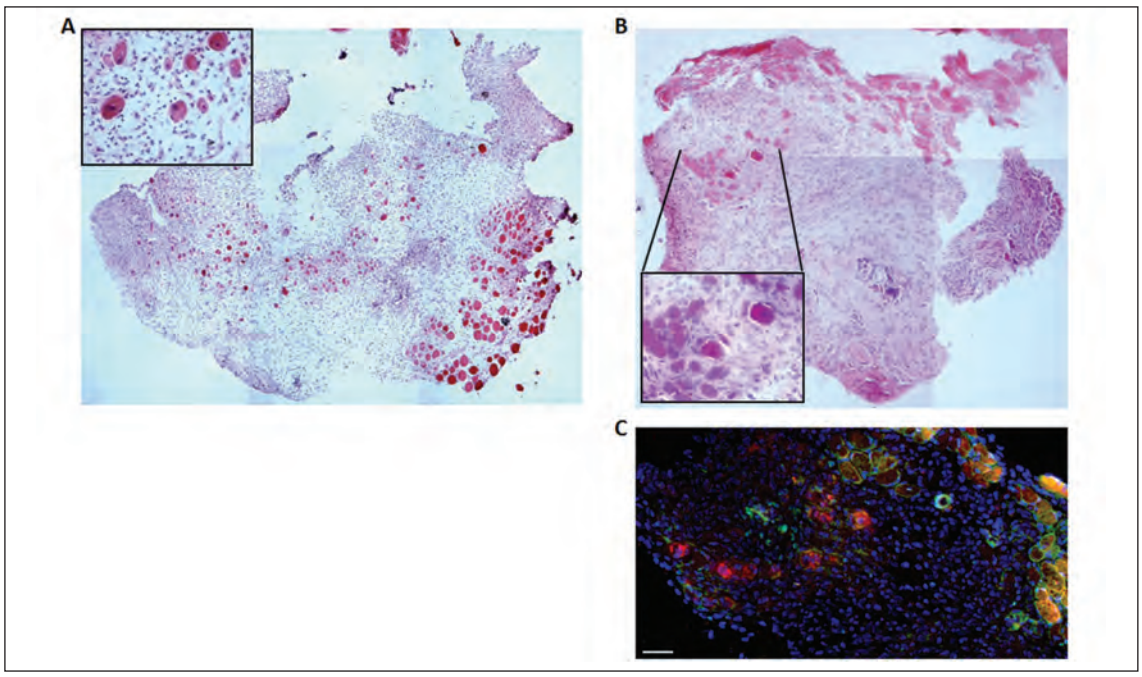


Fig. 3: La miogenesi nello *scaffold*. A e **B)** Colorazione ematossilina-eosina di *scaffold* derivante da muscolo TA analizzato a una settimana dal trapianto in topo singenico (A) e analizzato a due settimane dal trapianto in topo Nude (B) in sezione trasversale centrale (ricostruzione fotografica). **C)** Immunofluorescenza per Myosin Heavy Chain in rosso e sarcoglicano-β in verde su sezione trasversale centrale di *scaffold* derivante da muscolo TA analizzato a due settimane dal trapianto in topo Nude. I nuclei sono colorati con Hoechst in blu. Barra = 50 micron.

Tabella 1

	2 settimane			4 settimane		
	CD3	**Gr-1**	**Mac3**	**CD3**	**Gr-1**	**Mac3**
Sano	n.a.	n.a.	n.a.	4 ± 2	10 ± 4	24 ± 8
Controlaterale	3 ± 1	8 ± 3	35 ± 2	2 ± 2	9 ± 2	33 ± 4
Scaffold	14 ± 3	48 ± 6	20 ± 9	6 ± 1	43 ± 10	35 ± 2

Tabella. 1: Quantificazione della sottopolazione cellulare CD45^{+}. Analisi citofluorimentrica delle cellule esprimenti CD45 estratte da: muscolo TA sano, contro laterale e scaffold trapiantato, rispettivamente, a due e quattro settimane dal trapianto. Eseguita un'analisi biparametrica per CD45 ed un marcatore dei linfociti (CD3), uno dei granulociti (GRA1) ed uno dei macrofagi (MAC3). La media percentuale delle cellule esprimenti CD45 ed il marcatore indicato è espressa in ±SEM; 4 < n < 8 per ogni sottopopolazione analizzata.

Nei nostri studi di interazione tra lo scaffold e ospite abbiamo trapiantato lo *scaffold* in topi singenici rispetto al donatore. I risultati del trapianto suggeriscono che si sviluppi una forte risposta immunitaria, che potrebbe essere responsabile dell'assorbimento dell'impianto (dati non mostrati). Tuttavia la degradazione della ECM di cui è costituito lo *scaffold* può rappresentare un processo bioattivo che, attraverso il rilascio di fattori solubili, contribuisce alla modulazione del comportamento cellulare [14]. Durante il processo infiammatorio le cellule mononucleate che invadono lo *scaffold* si distinguono in due popolazioni: cellule di natura infiammatoria, presentanti CD45, e cellule presentanti Sca1, un antigene marcatore di staminalità. L'ulteriore caratterizzazione delle cellule CD45 positive ha dimostrato un aumento della percentuale di cellule CD45^{+}/Gr-$^{1+}$, e quindi di granulociti, maggiore nello *scaffold* rispetto al muscolo controlaterale [15]. Tra le cellule staminali Sca1 positive sono presenti anche cellule staminali dal potenziale miogenico, ad esempio le PICs [7], come dimostrato dalle analisi di citofluorimetria e dall'espressione di PW1 [7]. Per attenuare la risposta infiammatoria abbiamo effettuato trapianti con topi Nude riceventi, tuttavia anche i topi atimici mostrano una risposta comparabile a quella del ricevente singenico di controllo. La scoperta più rilevante nei nostri studi è la presenza di fibre muscolari nascenti all'interno dello *scaffold* trapiantato. Possiamo inferire che il processo di miogenesi nello *scaffold* sia dovuto a cellule staminali miogeniche derivanti dal ricevente, poiché nessuna cellula sopravvive al trattamento in SDS. Lo *scaffold* costituisce pertanto un ambiente favorevole alla miogenesi, capace da solo di indurre cellule miogeniche dell'ospite a differenziare, evidenziando le proprietà di nicchia della ECM del muscolo scheletrico nella regolazione delle cellule staminali. Tutte

queste considerazioni suggeriscono che lo sviluppo di *scaffold* da muscolo scheletrico sia un promettente strumento nel futuro della medicina rigenerativa.

Bibliografia

1. Williams DF. On the nature of biomaterials. Biomaterials 2009; 30:5897-09.
2. Qing Q, Qin T Optimal method for rat skeletal muscle decellularization. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2009; 23:836-9.
3. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials 2007; 28:3587-93.
4. Conconi MT, De Coppi P, Bellini S, Zara G, Sabatti M, Marzaro M, et al. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. Biomaterials 2005; 26:2567-74.
5. Klumpp D, Horch RE, Kneser U, Beier JP. Engineering skeletal muscle tissue-new perspectives in vitro and in vivo. J Cell Mol Med 2010; 14:2622-9.
6. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusiondecellularized

matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat Med 2008; 14:213-21.

7. Mitchell KJ, Pannerec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, et al. Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. Nat Cell Biol 2010; 12:257-66.
8. Moresi V, Pristera A, Scicchitano BM, Molinaro M, Teodori L, Sassoon D, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibition of skeletal muscle regeneration is mediated by a caspase-dependent stem cell response. Stem Cells 2008;26: 997-1008.
9. Berardi E, Aulino P, Murfuni I, Toschi A, Padula F, Scicchitano BM, et al. Skeletal muscle is enriched in hematopoietic stem cells and not inflammatory cells in cachectic mice. Neurol Res 2008; 30:160-9.
10. Aulino P, Berardi E, Cardillo VM, Rizzuto E, Perniconi B, Ramina C, et al. Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexiainducing C26 colon carcinoma in mouse. BMC Cancer 2010; 10:363.
11. Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. Biomaterials 2011; 2:2489-99.
12. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. Nat Biotechnol 2005; 23:47-55.
13. Carlson EC, Carlson BM. A method for preparing skeletal muscle fiber basal laminae. Anat Rec (Hoboken) 1991; 230:325-31.
14. Li F, Li W, Johnson S, Ingram D, Yoder M, Badylak S. Low-molecular-weight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells. Endothelium 2004; 11:199-206.
15. Perniconi B, Costa A, Aulino P, Teodori L, Adamo S, Coletti D. The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffold from skeletal muscle. Biomaterials 2011; 32:7870-82.

L'inibizione del proteasoma modula i livelli di espressione dell'inibitore del ciclo cellulare p21^{CDKN1A} in seguito a danno al DNA, senza alterare la risposta apoptotica

Micol Tillhon[1], Ilaria Dutto[1], Ornella Cazzalini[2], Lucia A. Stivala[2], Ennio Prosperi[1]
[1]Istituto di Genetica Molecolare CNR, Pavia;
[2]Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sez. Patologia generale, Università di Pavia, Italy

e-mail: tillhon@igm.cnr.it

Introduzione

Studi sui meccanismi impiegati dalle cellule per difendersi da lesioni al DNA indotte da agenti chimici e fisici costituiscono un punto importante per capire come le cellule che perdono tali capacità di difesa si trasformino da normali a tumorali (1,2).

Negli ultimi anni, diverse ricerche hanno evidenziato che proteine coinvolte nei checkpoints del ciclo cellulare e nei processi di riparazione di danni al DNA possono colocalizzare a livello della lesione, indicando una stretta correlazione tra i due processi (3,4,5). In tale panorama risulta determinante comprendere il ruolo dei molteplici fattori coinvolti nei meccanismi di riconoscimento e riparazione di tali danni, tra cui quello dell'inibitore del ciclo cellulare p21^{CDKN1A} che svolge un ruolo importante anche nella regolazione della trascrizione e nel processo di morte cellulare programmata (6,7). Infatti, dati recenti hanno evidenziato un'implicazione di p21 nei meccanismi di riparazione di lesioni al DNA (8,9) e dimostrato che una significativa degradazione dell'inibitore del ciclo cellulare avviene in presenza di elevati livelli di danno (10), rendendo quindi l'intervento di p21 essenziale per il corretto funzionamento del macchinario riparativo (11,12).

Recentemente sono stati sviluppati nuovi approcci farmacologici che possono influenzare i livelli di espressione della proteina p21, permettendo in questo modo di contrastare la progressione tumorale; per esempio, molecole inibitrici delle istonedeacetilasi (HDAC) e del macchinario proteasomiale (13) sono in grado di produrre un aumento dei livelli di espressione di p21, con conseguente blocco della crescita delle cellule trasformate (14,15). Questi tipi di trattamento possono, comunque, essere potenzialmente dannosi se combinati con le tradizionali terapie chemioterapiche che inducono danni al DNA; infatti, è stato dimostrato che elevati livelli di p21 possono inibire il processo apoptotico e consentire la riparazione di lesioni al DNA, rendendo così le cellule cancerose poco sensibili ai trattamenti anti-tumorali.

A sostegno di quanto riportato, diversi studi hanno evidenziato che cellule difettive per p53 e/o p21 mostrano una scarsa attività riparativa (16); sulla base di queste ricerche, è stato ipotizzato un possibile ruolo di p21 all'interno del processo riparativo. Al contrario un'inibizione di tale pathway è stata suggerita all'aumentare della concentrazione della proteina. Questa ipotesi è, inoltre, supportata dal fatto che p21 possa interagire con PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) altro importante fattore coinvolto durante le fasi di replicazione e riparazione del DNA (17).

Dati più recenti forniscono ulteriori argomenti a supporto di un ruolo chiave di p21 per il corretto funzionamento del sistema di riparazione del DNA. Infatti, è stato suggerito l'intervento di p21 nella regolazione dell'attività istoneacetiltransferasica di p300, co-fattore trascrizionale implicato in differenti processi cellulari, tra cui la modulazione dello stato di condensazione della cromatina e coinvolgimento nel pathway riparativo. L'attività di p300 è inibita dal legame con PCNA e l'intervento di p21 permette la dissociazione dei due fattori, rendendo p300 nuovamente libera ed enzimaticamente attiva (18). È stato inoltre osservato che p21 è degradata attraverso il pathway ubiquitina-proteasoma a seguito di danno al DNA (19). Nonostante i numerosi dati riportati in letteratura riguardo a questi complessi meccanismi, gli effetti della regolazione dei livelli di espressione di p21 durante i processi riparativi, in particolare durante il processo per escissione nucleotidica (NER) sono ancora poco chiari.

Nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli inibitori delle HDAC non influenzano significativamente il NER, mentre non risultano esserci chiare informazioni riguardanti gli effetti degli inibitori proteosomiali sui meccanismi di riparazione.

In questo lavoro abbiamo, dunque, valutato se l'induzione di elevati livelli di espressione della proteina p21, da parte dell'inibitore proteasomiale MG132 (14), possa compromettere l'efficienza di riparazione del sistema NER e l'attivazione del processo apoptotico. È stato, quindi, analizzato il reclutamento di p21 e di PCNA a livello dei siti di danno al DNA e successivamente determinata l'efficienza del NER in fibroblasti primari umani LF-1.

I nostri dati hanno così mostrato che trattamenti con MG132 portano ad un accumulo delle proteine PCNA e p21 a livello del sito di lesione. Tuttavia, l'efficienza riparativa del sistema NER risultava ridotta dopo inibizione del proteasoma con conseguente aumento della percentuale di cellule apoptotiche.

Questi risultati suggeriscono che l'inibitore MG132 possa compromettere la funzionalità del macchinario riparativo, favorendo l'induzione del processo apoptotico, indipendentemente dalla presenza di alti livelli di p21.

Materiali e metodi

Colture cellulari e trattamenti

Gli esperimenti di seguito riportati sono stati condotti su colture di fibroblasti primari umani LF-1, fornitici dal Professor J. Sedivy (Università Brown, Providence, USA).

Le cellule sono state coltivate in terreno E-MEM (con l'aggiunta di: 10% FBS, 100 μg penicillina, 1% sodio piruvato) in condizioni di sterilità, a 37°C ed in atmosfera umidificata al 5% di CO_2.

I trattamenti con l'inibitore MG132 (Sigma/Aldrich) sono stati condotti in terreno di coltura alla concentrazione finale di 25 μM.

L'irraggiamento dei campioni cellulari con luce UV-C (0.5 J/m^2/s), tramite lampada T-UV9 (Philips), è stato effettuato 5 ore dopo trattamento con MG132; per ottenere lesioni localizzate in regioni puntiformi del nucleo, ogni campione è stato irraggiato ponendo nella capsula Petri di coltura un filtro di policarbonato (Millipore), con pori di 3 μm di diametro. Dopo la radiazione, le cellule sono state reincubate in terreno fresco (privo di inibitore proteasomiale), a 37°C per differenti tempi di recupero.

Immunofluorescenza e analisi mediante microscopio a fluorescenza

Fibroblasti LF-1 sono stati seminati su vetrino coprioggetto e trattati come precedentemente descritto. In seguito, dopo essere stati sottoposti a lisi ipotonica *in situ* (tampone di lisi: 10 mM Tris-HCl; 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Igepal, 10 mM β-glicerofosfato, 0.1 mM sodio ortovanadato, 0.2 mM PMSF) a 4°C per 8 minuti e successivo lavaggio per 4 minuti in agitazione a temperatura ambiente (tampone di lavaggio: 10 mM Tris-HCl; 2.5 mM $MgCl_2$, 10 mM β-glicerofosfato, 0.1 mM sodio ortovanadato, 0.2 mM PMSF), i diversi campioni cellulari sono stati sottoposti a fissazione in 2% formaldeide per 5 minuti e successivamente in 70% etanolo. Per il saggio di immunofluorescenza i campioni sono stati bloccati con PBA (PBS + 0.2% Tween 20 + 1% BSA) in agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti; successivamente si è passati alla colorazione con specifici anticorpi primari (anti-p21 policlonale prodotto in coniglio, N-20, Santa Cruz; anti-p21 monoclonale prodotto in topo, DCS60.2, Neomarkers; anti-PCNA monoclonale prodotto in topo, PC-10, Dako) per 1 ora a temperatura ambiente. I vetrini sono poi stati incubati con gli opportuni anticorpi secondari (coniugati con i fluorocromi Alexa 488 o Alexa 594) per 30 minuti a temperatura ambiente. La colorazione nucleare è stata poi ottenuta tramite incubazione con Hoechst 33258 (0,1 μg/ml in PBS) per 2 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Successivamente i vetrini sono stati montati su vetrino portaoggetto con Mowiol (Calbiochem) per permettere una maggior durata del segnale fuorescente.

Infine si è passati all'osservazione dei differenti campioni al microscopio a fluorescenza Olympus BX51.

Saggio di incorporazione di BrdU per lo studio della sintesi riparativa del DNA

Dopo esposizione a radiazione UV-C, campioni di fibroblasti LF-1, seminati su vetrino coprioggetto, trattati e non con MG132, sono stati incubati per 3 ore a 37°C con 100 μM bromodeossiuridina (BrdU), per poi essere fissati in 70% etanolo. La colorazione è stata preceduta da idrolisi acida (2N HCl per 30 minuti, 0.1 M sodio tetraborato pH 8.2 per 15 minuti), per permettere la denaturazione del DNA; i campioni sono poi stati bloccati con PBA in agitazione a temperatura ambiente per 20 minuti, incubati con anticorpo primario monoclonale prodotto in topo anti-BrdU, successivamente incubati con anticorpo secondario anti-topo marcato con Alexa 488 prodotto in capra e in seguito incubati con secondario anti-capra prodotto in asino (Alexa 488) per 30 minuti a temperatura ambiente. Si è poi passati alla colorazione del DNA, come visto in precedenza, con Hoechst 33258 e al montaggio dei vetrini con Mowiol (Calbiochem).

Risultati

L'inibitore proteasomiale MG132 aumenta i livelli di espressione della proteina p21.

Per confermare che l'inibitore proteasomiale MG132 possa indurre l'accumulo di p21 inibendo il normale turnover della proteina, sono stati analizzati, tramite saggio di immunofluorescenza, campioni di fibroblasti primari umani (LF-1) di controllo e campioni sottoposti a trattamento con MG132 (25 μM, per 5 ore). La colorazione è stata effettuata tramite anticorpo primario monoclonale diretto contro la proteina p21 e successiva incubazione con opportuno anticorpo secondario anti IgG di topo marcato con il fluorocromo Alexa 488.

Come si può osservare in *Figura 1*, dopo trattamento con l'inibitore proteasomiale, l'espressione della proteina

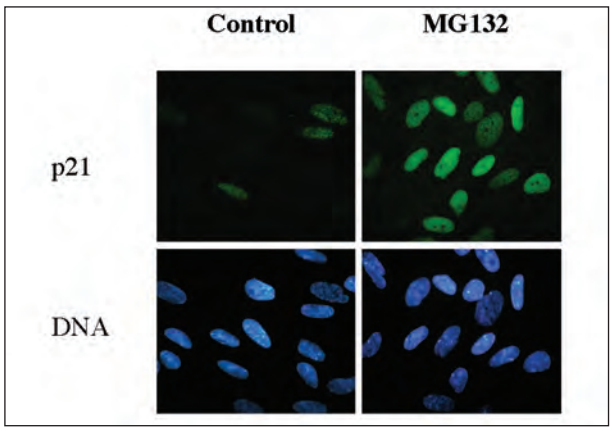


Fig. 1. Analisi tramite saggio di immunofluorescenza dei livelli di espressione della proteina p21 in fibroblasti primari umani LF-1; i campioni corrispondono a cellule non trattate (control) e a cellule sottoposte a trattamento con l'inibitore proteasomiale (MG132). I campioni sono stati sottoposti a colorazione con anticorpo policlonale diretto contro la proteina p21 (fluorescenza verde); la colorazione nucleare è stata ottenuta con Hoechst 33258 (fluorescenza blu).

p21 risulta aumentata, rispetto ai fibroblasti di controllo che non hanno ricevuto il trattamento, in cui i livelli di tale fattore risultano basali.

Questi dati preliminari sono stati utili per allestire saggi successivi che ci hanno permesso di analizzare se l'accumulo di p21, indotto da trattamento con MG132, possa interferire con l'efficienza del processo di riparazione NER.

MG132 induce un accumulo persistente di p21 e PCNA a livello dei siti di riparazione del danno al DNA

Studi di immunofluorescenza sono stati allestiti con lo scopo di comprendere se in seguito a trattamenti con MG132 vi sia un accumulo di fattori del NER a livello della regione danneggiata del DNA. Fibroblasti LF-1 sono stati sottoposti a trattamento con 25 μM MG132 e successivamente irraggiati con UV-C (30 J/m^2/s) con l'ausilio di un filtro di policarbonato, in modo da creare danno localizzato in piccole regioni nucleari; dopo radiazione le cellule sono state reincubate in termostato a 37°C al 5% CO_2 per tempi di 30 minuti o 4 ore. In parallelo sono stati allestiti dei campioni di controllo non trattati con MG132, ma sottoposti alla medesima radiazione e agli stessi tempi di recupero. Successivamente le cellule sono state sottoposte a lisi *in situ,* fissazione e incubate con anticorpi specifici per p21 e PCNA.

La *Figura 2* evidenzia che, in cellule di controllo dopo 30 minuti dall'irraggiamento, sia p21 che PCNA risultano essere reclutate al sito di riparazione e che i loro livelli si riducono dopo 4 ore. Al contrario, in cellule sottoposte a trattamento con l'inibitore proteasomiale è possibile osservare elevati livelli delle due proteine dopo 30 minuti, che permangono anche dopo 4 ore dalla radiazione; questi dati, quindi, indicherebbero che il trattamento con MG132 induce un aumento dell'accumulo di p21 e PCNA ai siti di riparazione dopo danno al DNA.

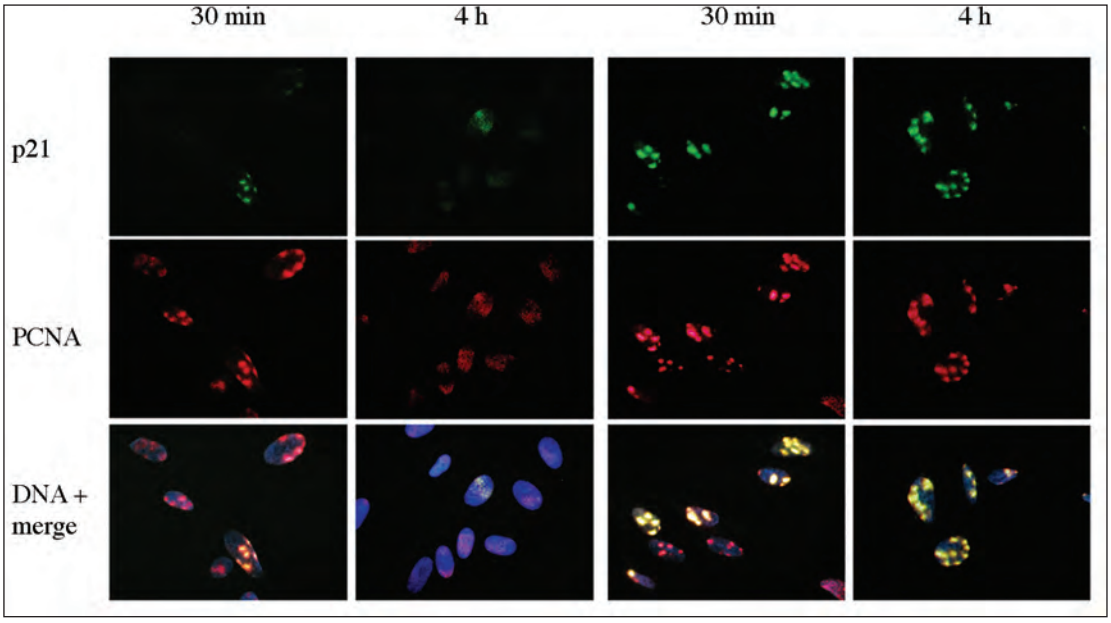


Fig. 2. Analisi tramite saggio di immunofluorescenza dei livelli delle proteine p21 e PCNA in fibroblasti primari umani LF-1 dopo trattamento con l'inibitore proteasomiale MG132 (25 μM). L'irraggiamento con radiazione UV-C è stato effettuato utilizzando un filtro di policarbonato che permette di ottenere lesioni localizzate in regioni puntiformi del nucleo e il processamento dei campioni è avvenuto dopo 30 minuti o 4 ore. L'osservazione al microscopio confocale ha permesso di valutare l'accumulo di p21 (fluorescenza verde) e PCNA (fluorescenza rossa) dopo trattamento con MG132 ad entrambi i tempi; la co-localizzazione delle due proteine ai siti di danno è associata al segnale giallo mentre la colorazione con Hoechst 33258 (fluorescenza blu) ha permesso di identificare i nuclei.

Effetto dell'inibitore MG132 sull'efficienza di riparazione del danno al DNA e sull'induzione del processo apoptotico

Per analizzare l'effetto dell'inibitore proteasomiale MG132 sull'efficienza riparativa, sono stati allestiti esperimenti di immunofluorescenza in modo da valutare l'incorporazione di bromodeossiuridina (BrdU) a livello del sito di danno al DNA .

Campioni di fibroblasti LF-1 di controllo e campioni trattati con 25 μM MG132 sono, quindi, stati sottoposti a radiazione UV-C (30 J/m^2/s) con l'ausilio di un filtro di policarbonato (che permettesse danno localizzato al DNA).
Successivmente è stata aggiunta BrdU (100 μM) al terreno di coltura e i campioni così trattati sono stati reincubati in termostato a 37°C per 3 ore (in assenza di MG132). I campioni sono poi stati sottoposti ad idrolisi acida (per permettere la denaturazione del DNA) e colorazione con anticorpo monoclonale anti-BrdU.
È possibile osservare in *Figura 3* che cellule trattate con l'inibitore proteasomiale mostrano una minore efficienza riparativa, corrispondente ad una minore incorporazione di BrdU in seguito ad esposizione a radiazione ultravioletta (44,5% di cellule positive alla colorazione); al contrario, cellule non trattate, ma esposte a luce UV-C sono caratterizzate da una maggiore incorporazione di BrdU (90,9% di cellule positive alla colorazione), dato indicativo di un'elevata sintesi riparativa.
Dato che il trattamento con MG132 compromette la funzionalità del sistema riparativo e per capire se la presenza di elevati livelli di p21 (indotti dall'inibitore proteasomiale) possano inibire il processo apoptotico, sono stati condotti specifici saggi volti a valutare morfologicamente l'induzione di morte cellulare programmata in risposta a danni al DNA.
A questo scopo fibroblasti LF-1 sono stati sottoposti a trattamento con 25 μM MG132 per 5 ore dopo radiazione UV-C (10 J/m^2/s); successivamente le cellule sono state incubate in termostato a 37°C per 8 ore per poi essere fissate e colorate con Hoechst 33258. L'osservazione al microscopio a fluorescenza ha poi permesso di effettuare dei conteggi rappresentativi del numero di cellule apoptotiche, evidenziando che nei campioni irraggiati e trattati con MG132 la percentuale di cellule in apoptosi era maggiore rispetto ai campioni che avevano subito la sola radiazione UV-C (*Figura 4*). È altresì interessante osservare che il solo trattamento con la molecola MG132 è già in grado di indurre il processo di morte cellulare programmata.

Discussione

L'importanza del ruolo di p21 in differenti processi cellulari, tra cui i sistemi di risposta a danni al DNA, ha favorito lo sviluppo di numerose ricerche su questo inibitore del ciclo cellulare.
I nostri esperimenti sono stati disegnati allo scopo di verificare se la presenza di elevati livelli di espressione

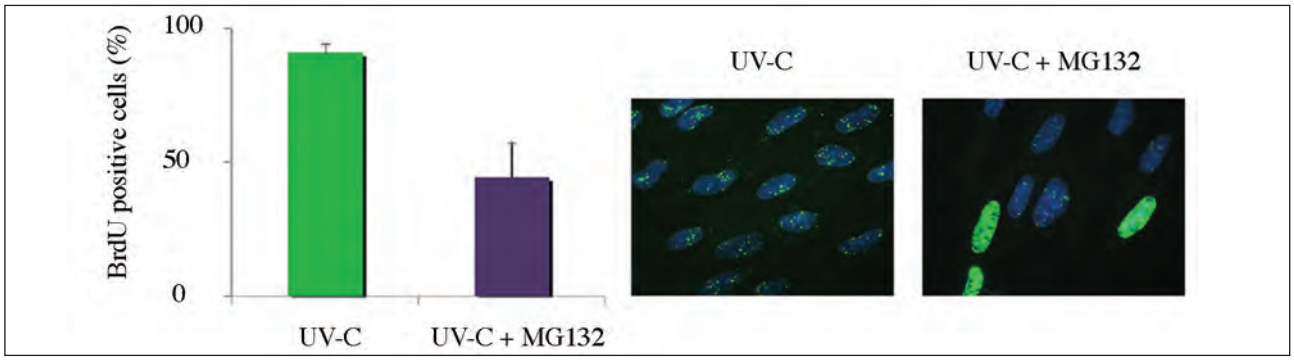


Fig. 3. Analisi dell'efficienza riparativa tramite saggio di incorporazione di BrdU in cellule LF-1 dopo trattamento con MG132 (25 μM). In seguito a irraggiamento con UV-C, cellule non trattate con l'inibitore proteasomiale (UV-C) mostrano una maggiore capacità riparativa (fluorescenza verde) rispetto a cellule precedentemente trattate con MG132 (UV-C+MG132). In grafico sono riportate le percentuali relative all'efficienza riparativa dei due campioni con la relativa deviazione standard (n=2); la colorazione con Hoechst 33258 (fluorescenza blu) ha permesso di identificare i nuclei.

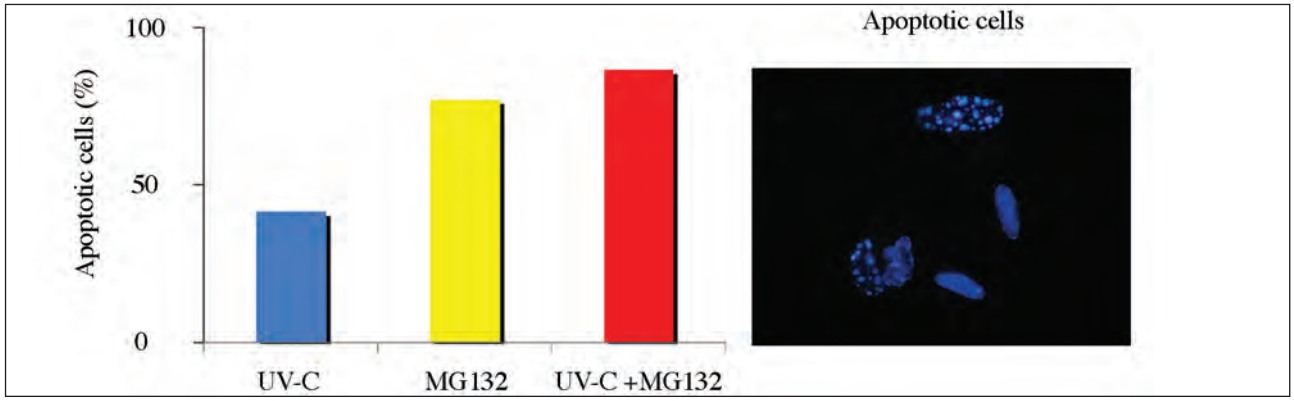


Fig. 4. Analisi dell'induzione del processo apoptotico dopo trattamento con MG132 (25 μM) in cellule LF-1. I differenti campioni sono stati irraggiati con luce UV-C in presenza o assenza di trattamento con l'inibitore proteasomiale; sono stati preparati anche campioni non irraggiati trattati con MG132. Successivamente si è passati alla colorazione con Hoechst 33258 (fluorescenza blu) per l'osservazione (tramite microscopio a fluorescenza) dello stato di condensazione della cromatina. In grafico sono riportate le percentuali relative alla frazione cellulare apoptotica presente nei diversi campioni.

della proteina p21, indotti in seguito a trattamenti con l'inibitore proteasomiale MG132, potesse influenzare il pathway riparativo, permettendo così di spiegare la presenza di questa proteina a livello dei siti di danno al DNA; la scelta di utilizzare come inibitore proteasomiale la molecola MG132 deriva dal fatto che questa classe di composti (come per esempio Bortezomib, Lactacystin e Epoxymicin) è allo stadio di valutazione per possibili impieghi nei trattamenti chemioterapici.

I nostri studi hanno permesso di analizzare che l'MG132 induce un significativo accumulo di p21 ed un'inibizione del sistema di riparazione NER; è stato inoltre osservato che in seguito a danno al DNA (causato da esposizione a luce UV-C), dopo trattamento con MG132, elevati livelli di p21 non inibiscono il processo apoptotico, ma al contrario, permettono l'attivazione del processo di morte cellulare programmata, in modo più significativo rispetto alla condizione di solo irraggiamento.

Questi dati possono essere spiegati dal fatto che in seguito a trattamento con l'inibitore proteasomiale, l'accumulo di p21 avviene nel nucleo, mentre per avere inibizione del processo di apoptosi p21 dovrebbe essere localizzata a livello citoplasmatico (11).

Esperimenti di immunofluorescenza ci hanno permesso di dimostrare che dopo trattamento con MG132 e irraggiamento UV-C, p21 e PCNA si accumulano a livello del sito di lesione al DNA.

I risultati sopra descritti suggeriscono, quindi, che p21 possa svolgere un ruolo decisivo all'interno del macchinario riparativo, influenzando la corretta progressione del sistema NER e che l'inibizione della degradazione proteasomiale possa inoltre favorire il processo apoptotico in linee cellulari tumorali esposte ad agenti danneggianti il DNA, compromettendo il processo di riparazione.

L'uso di inibitori della degradazione proteasomiale, in associazione con agenti danneggianti il DNA, può quindi essere una strategia promettente per il trattamento di neoplasie resistenti alle tradizionali terapie anti-neoplastiche.

Bibliografia

1. Pieper R.O., Nickoloff J.A., Hoechstra M.F. (1998). DNA Repair in Higher eukaryotes. DNA Damage and Repair. 2: 33-49.
2. Britt A.B. (1999). Molecular genetics of DNA repair in higher plants. TIPS. 4: 20-25.
3. Hartwell L.H., Kastan M. B. (1994). Cell cycle control and cancer. Science. 266: 1821-1828.
4. Hoejimakers J.H.J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature. 411: 366-374.
5. Mitchell J.R., Hoejimakers J.H.J.,and Niedernhofer L.J. (2003). Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. Curr. Opin. Cell. Biol. 15: 232-240.
6. Xu S.Q., El Deiry W.S. (2000). p21WAF1/Cip1 inhibits caspase cleavege by TRAIL death receptor DR4. Biochem.biophys. Res.Commun. 269: 179-190.
7. Suzuki A., Tsutomi Y., Akahane K., Araki T., Miura M. (1998). Resistance to fs-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle p21WAF/Cip1 and IAP gene family ILP. Oncogene. 17: 931-939.
8. Stivala L.A., Riva F., Cazzalini O., Savio M., and Prosperi E. (2001). p21(waf1/cip1)-null human fibroblasts are deficient in nucleotide excision repair downstream the recruitment of PCNA to DNA repair sites. Oncogene. 20: 563-70.
9. Cazzalini O., Donà F., Savio M., Tillhon M., Maccario C., Perucca P., Stivala L.A., Scovassi A.I. and Prosperi E. (2010). p21CDKN1A participates in base excision repair by regulating the activity of poly(ADP-ribose) polymerase-1. DNA Repair. 9(6):627-35.
10. Savio M., Coppa T., Cazzalini O., Perucca P., Necchi D., Nardo T., Stivala L.A., Prosperi E. (2009). Degradation of p21CDKN1A after DNA damage is independent of type of lesion, and is not required for DNA repair. DNA Repair. 8(7):778-85.
11. Cazzalini O., Scovassi A.I., Savio M., Stivala L.A., and Prosperi E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. Mutat. Res. 704(1-3):12-20.
12. Tillhon M., Cazzalini O., Stivala LA., Scovassi AI., Prosperi E. (2010). Involvement of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in DNA repair processes. In: DNA Damage Repair, Repair Mechanisms and Aging (Ed. Allison E. Thomas), Nova Science (Hauppauge, USA): 123-140.
13. Stivala L.A., Cazzalini O., Prosperi E. (2012). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21CDKN1A as a Target of Anti-Cancer Drugs. Curr Cancer Drug Targets. 12(2):85-96.
14. Takeshita T., Wu W., Koike A. (2009). Perturbation of DNA repair pathways by proteasome inhibitors corresponds to enhanced chemosensitivity of cells to DNA damage- inducing agents. Cancer Chemother. Pharmacol. 64 : 1039-1046.
15. Motegi A., Murakawa Y.,Takeda S. (2009). The vital link between the ubiquitin-proteasome pathway and DNA repair: impact on cancer therapy Cancer letters. 283 : 1-9.
16. Sheikh M.S., Chen Q., Smith M.L., Fornace A.J.Jr. (1997). Role of p21 in cell death and DNA repair as studied using a tetracycline-inducible system in p53-deficient cells. Oncogene. 14: 1875-1882.
17. Adimoolam S., Lin C.X., and Ford J.M. (2001). The p53-regulated Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), Is Not Required for Global Genomic and Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair of UV-induced DNA Photoproducts. Journal of Biol. Chem. 276: 25813–25822.
18. Cazzalini O., Perucca P., Savio M., Necchi D., Bianchi L., Stivala L.A., Docummun B., Scovassi A.I. And Prosperi E. (2008). Interaction of p21^{CDKN1A} with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair. Nucleic Acid Res. 36: 1713-1722.
19. Bendjennat M., Boulaire J., Jascur T., Brickner H., Barbier V., Sarasin A., Fotedar A. and Fotedar R. (2003). UV irradiation triggers ubiquitin dependent degradation of p21WAF1 to promote DNA repair. Cell. 114: 599–610.

News in Bibliografia

a cura di "Marty DV."

Single-Cell Mass Cytometry Adapted to Measurements of the Cell Cycle

Gregory K. Behbehani, Sean C. Bendall, Matthew R. Clutter, Wendy J. Fantl, Garry P. Nolan
Cytometry A, DOI: 10.1002/cyto.a.22075

Mass cytometry is a recently introduced technology that utilizes transition element isotope-tagged antibodies for protein detection on a single-cell basis. By circumventing the limitations of emission spectral overlap associated with fluorochromes utilized ……. . Recently, a comprehensive mass cytometry analysis was described for the hematopoietic differentiation program …… . The current study describes approaches to delineate cell cycle stages utilizing 5- iodo-2-deoxyuridine (IdU) to mark cells in S phase, simultaneously with ……. that characterize the other cell cycle phases. Protocols were developed in which an antibody …… was used to separate cells in G0 and G1 phases of the cell cycle. This mass cytometry method yielded cell cycle distributions of both normal and cancer cell populations ……. . We applied this to map the cell cycle phases of cells …… .

La citometria di massa utilizza la coniugazione di anticorpi con ioni metallo invece dei convenzionali fluorocromi. Recentemente utilizzando la spettrometria di massa in citometria è stato possibile aumentare il numero dei parametri/cellula da poter misurare. La "time of flight spectrometry è un metodo della spettrometria di massa in cui gli ioni da analizzare vengono accelerati da un campo elettrico di intensità nota.
Questa accelerazione dà ad ogni ione un'energia cinetica proporzionale alla sua carica, ma indipendente dalla sua massa. Viene quindi misurato il tempo che occorre alla particella per raggiungere un rivelatore ad una distanza conosciuta. Dato che la velocità dello ione dipende dal rapporto massa/carica (le particelle più pesanti raggiungono velocità più basse), da questo tempo e dai parametri sperimentali noti si può calcolare il rapporto massa/carica dello ione. La single-cell-mass- cytometry è stata recentemente utilizzata per caratterizzare lo stato di signaling in una frazione di cellule in campioni umani di midollo, analizzando simultaneamente 34 parametri diversi, alcuni markers di superficie, altri relativi a segnali intracellulari. In questo lavoro sono stati misurati numerosi parametri di cinetica cellulari in popolazioni cellulari finemente caratterizzate per immunofenotipo, utilizzando sia anticorpi legati ad ioni-metallo specifici per proteine che vengono espresse dalle cellule nelle fasi del ciclo cellulare G_0, G_1, G_2 e mitosi, sia la 5-iodo-2-desossio-uridina (IdU) per studiare le cellule della fase S. E' stato utilizzato un anticorpo anti- Rb per valutare la frazione di cellule in G_0 confrontando la metodica tradizionale che utilizza il segnale fluorescente con la single-mass cytometry.
Questo lavoro segnala come la single–cell mass cytometry ha permesso di determinare proteine coinvolte nel ciclo cellulare in modo sensibile e quantitativo in popolazioni cellulari eterogenee caratterizzate finemente dal punto di vista fenotipico. In futuro, con la disponibilità di nuovi reagenti (ioni-metallo), queste analisi potranno essere estese per la determinazione di nuovi markers di superficie o di proteine intracellulari coinvolte nella sopravvivenza, la proliferazione, il metabolismo cellulare, la morte cellulare, la risposta al danno al DNA dopo trattamento con farmaci antitumorali.

Eugenio Erba
Unità di Citometria a Flusso
Istituto Mario Negri, Milano
eugenio.erba@marionegri.it

Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and ROS-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity.

Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y.
e-mail: ibuki@u-shizuoka-ken.ac.jp
Environ Sci Technol. 2012 Jun 15

… recently clarified that the side-scatter(ed) light (SSC) of flow cytometry (FCM) could be used as a guide to measure the uptake potential of nanoparticles …… the method was improved …… uptake potential of nanoparticles and the production of reactive oxygen species (ROS), and correlations with genotoxicity…… . In the FCM analysis, SSC and fluorescence of DCFH-DA

based on ROS production were concurrently detected …… nanoparticles. The ZnO and CuO nanoparticles caused high ROS production, ……. suggesting that the extent of ROS production based on the uptake of nanoparticles differed with each kind of nanoparticle……. a marker of DNA damage, ……. it possible to predict not only uptake potential but also genotoxici

Gli Autori dell'Università di Shizuoka in Giappone propongono l'aggiornamento di un metodo che hanno messo a punto, alcuni anni orsono, che permetterebbe la valutazione del potenziale uptake, la produzione di ROS e la correlazione con la possibile genotossicità di nanoparticelle; utilizzano il side-scattered e la fluorescenza di DCFH-DA per monitorare gli effetti di alcuni ossidi metallici come ZnO e TiO2 che sono stati e sono oggetto di numerosi studi di tossicologia, con metodologie molto diverse; infatti è noto che ZnO ed altri ossidi posso indurre la produzione di ROS.
L'articolo è strutturato con un testo ed un iconografia molto chiari ed inizia con la descrizione delle attuali difficoltà per l'individuazione di un metodo di screening standardizzato, per valutare la tossicità delle nanoparticelle e questo sembra dovuto alla difficoltà nel determinare con accuratezza le proprietà fisico-chimiche e biologiche delle particelle responsabili della tossicità.
Gli Autori descrivono nei risultati le correlazioni tra uptake cellulare, produzioni di ROS e danni al DNA indotti dalle nanoparticelle e concludono definendo questo metodo semplice e che può essere usato su cellule vitali, come primo strumento per uno screening iniziale di genotossicità di nanoparticelle. Risulterà interessante leggerlo sia per i Colleghi che si occupano di nanoparticelle o comunque di effetti nocivi, ma anche ai più interessati a conoscere nuove metodologie citometriche.

Raffaele De Vita
devita@enea.it

Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells.

Mund JA, Estes ML, Yoder MC, Ingram DA Jr, Case J.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Apr;32(4):1045-53.

In questo studio Mund e colleghi (Indianapolis) si sono posti l'obiettivo di identificare e caratterizzare 2 popolazioni distinte di cellule endoteliali circolanti che includono le endothelial colony-forming cell (ECFC, ad oggi la popolazione cellulare di riferimento per la definizione dei progenitori endoteliali), mediante citometria a flusso policromatica (PFC), saggi clonogenici, selezione immunomagnetica e microscopia elettronica. Sono state analizzate cellule mononucleate da sangue cordonale umano e da sangue periferico, utilizzando recentemente pubblicato PFC protocollo. È stata identificata una popolazione cellulare contenente sia progenitori endoteliali che cellule endoteliali circolanti mature caratterizzata dall'espressione di CD34, CD31, e CD146 e dalla mancata espressione di AC133 e CD45. Queste cellule (purificate con separazione immunomagnetica), non sono in grado di formare colonie emopoietiche, ma sono in grado di generare colonie endoteliali con le caratteristiche di ECFC.
La frequenza delle ECFC è aumentata nel cordone ombelicale, mentre questi progenitori sono estremamente rari nel sangue periferico di soggetti adulti sani. Il protocollo citometrico utilizzato in questo studio consente di individuare questi elementi cellulari di origine endoteliale nel sangue periferico; viceversa, gli autori producono evidenza che i più comuni protocolli di analisi citofluorimetrica utilizzati in letteratura identificano preferibilmente vescicole extracellulari.

Matteo G Della Porta
matteo@haematologica.org

Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use

Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S.
Circ Res. 2012 Feb 17;110(4):624-37.

Diversi subset di cellule progenitrici endoteliali (Endothelial Progenitor Cells, EPC) sono utilizzati attualmente in ambito sperimentale per il trattamento delle malattie ischemiche, ed i livelli circolanti di EPC sono considerati come biomarcatori clinicamente utili nelle malattie coronariche e nelle arteriopatie periferiche. Tuttavia, nonostante i significativi passi avanti fatti negli ultimi anni nella definizione del loro potenziale in ambito diagnostico e terapeutico, ulteriori progressi sono resi difficili da questioni irrisolte circa la definizione e il meccanismo d'azione delle EPC. Infatti sono stati messi a punto differenti metodi di coltura e diversi protocolli di analisi citofluorimetrica per individuare e caratterizzare le EPC, ma ad oggi non vi è unanime concordanza su quale sia la popolazione cellulare identificata sulla base di saggi clono genici e/o dell'espressione di marcatori immunofenotipici che individui i veri progenitori endoteliali. Questo articolo rivedere criticamente i protocolli più comunemente utilizzati per definire EPC (saggi clono genici, citometria a flusso) finalizzati ad utilizzo diagnostico e terapeutico, e delinea nuovi percorsi di ricerca per migliorare le conoscenze sulla biologia EPC.

Matteo G Della Porta
matteo@haematologica.org

Seasonal variation in vitamin D_3 levels is paralleled by changes in the peripheral blood human T cell compartment

Khoo AL, Koenen HJ, Chai LY, Sweep FC, Netea MG, van der Ven AJ, Joosten I.
louisaileng@gmail.com
PLoS One. 2012;7(1):e29250. Epub 2012 Jan 3.

Negli ultimo anni è emerso come la Vitamina D_3 (Vit D_3) sia in grado di influenzare crescita, differenziazione e funzione delle cellule del sistema immune innato ed acquisito, in particolare i livelli di Vit D_3 modulerebbero la produzione di citochine infiammatorie. I risultati in tal senso renderebbero interessante l'utilizzo della Vit D_3 a scopo terapeutico in malattie autoimmuni infiammatorie Dato che la principale fonte di Vit D_3 è la produzione UVB-indotta, le variazioni di esposizione all'ultravioletto (UV) influenzano lo status ed i livelli di Vit D_3 a tal punto che una ridotta esposizione al sole e di conseguenza deficit dei livelli di Vit D_3 sarebbero considerati fattori di rischio per lo sviluppo di malattie autoimmuni.
Uno dei target della Vit D_3 è rappresentato dai linfociti T, che esprimono il recettore per Vit D_3, soprattutto quando sono attivati. Inoltre numerosi lavori hanno dimostrato che Vit D_3 promuoverebbe il fenotipo Th2 e T regolatorio (Treg), a scapito delle componenti Th1 e Th17, influenzando il coro di alcune patologie autoimmuni. Sulla relazione tra Vit D_3 e livelli di citochine infiammatorie come Il-17 e TNF-α, in letteratura esistono dati contrastanti , probabilemte dipendenti dalle considerazioni che emergono da questo lavoro sulla variabilità del comparto T infiammatorio a livello periferico a seconda dell'esposizione ai raggi UV e di conseguenza ai livelli di Vit D_3. Inoltre altri autori hanno evidenziato che Vit D_3 svolge un ruolo importante anche sulla capacità di homing dei linfociti T in vitro e nei modelli animali.
Questo articolo fornisce delle evidenze sulla dinamica delle diverse popolazioni T nel distretto periferico in relazione ai cambiamenti fisiologici dello status di Vit D_3 in vivo a seconda dei livelli valutati nelle diverse stagioni dell'anno del metabolita 25(OH) D_3, che è il metabolita che meglio riflette lo status di Vit D_3.La prima osservazione degli autori è proprio la variabilità dei livelli serici registrati in una coorte di pazienti che ricevano lo stesso numero di ore di esposizione alla luce solare ed ai raggi UVB, con picchi significativamente superiori in estate rispetto all'autunno , e questo possiamo ritenerlo un risultato atteso. Da questa evidenza gli autori hanno preso lo spunto per analizzare il pool periferico dei linfociti T in termini di profilo memory-naive, funzione, homing.
Per quanto riguarda il primo punto, non mi trovo d'accordo con gli autori dell'articolo sulla definizione della componente T memory o naive sulla semplice espressione delle due isoforme del marcatore CD45 (CD45RA o CD45R0), in quanto è ormai evidente che c'è una transizione dei linfociti T memoria da CD45R0 a CD45RA, in seguito a stimolazioni antigeniche croniche (come quelle che potrebbero essere presenti in un contesto autoimmune con presenza continua di auto antigeni), quindi la popolazione CD45RA potrebbe contenere sia linfociti T naive sia cellule terminal-effector memory. Per una più fine discriminazione è necessario l'utilizzo combinato del marcatore CD45RA con il recettore chemochinico CCR7. Comunque , secondo gli autori, è presente nella loro coorte uno shift a favore della componente TCD4+CD45RA+ in inverno ed autunno sia nella sottopopolazione TCD4+ sia TCD8+ intermini percentuali, ma non in termini assoluti. Questo aggiunge un ulteriore elemento a favore dell'estrema plasticità della popolazione T, che al suo interno si modifica, pur non cambiando in numero assoluto; sulla base delle informazioni che gli vengono trasmesse dall'immunità innata. Infatti, l'immunità innata è la vera interfacie tra gli agenti patogeni che circolano nell'ambiente e l'immunità T, ed anche a questo livello ci sono numerosi lavori che riportano l'influenza di Vit D_3 e l'espressione e funzione dei loro recettori come i Toll like receptors.
Relativamente al braccio regolatorio T, i livelli di 25(OH) D_3 sembrano correlare direttamente con una migliore funzione soppressiva, piuttosto che ad un incremento del numero assoluto. Questo potrebbe dipendere da una maggiore espressione del marcatore nucleare Foxp3 e come suggerito da altri autori da un'influenza di Vit D_3 sulla progressione nel ciclo cellulare delle Treg.
Dal punto di vista funzionale, gli autori riportano effetti inibitori da parte di 25(OH) D_3 sulla frequenza dei linfociti che producono citochine infiammatorie, come IFN-y, IL-17 e IL-2 in linea con altri dati in vitro e nei modelli animali. Per quanto riguarda le proprietà di homing, i risultati sono a favore di una maggiore espressione di recettori chemochinici responsabili della migrazione verso cute, intestino ed organi linfoidi indotta dai livelli di Vit D_3 sui TCD4+ compresi i linfociti Treg.
Quindi, in conclusione, i risultati riportati in questo lavoro suggeriscono che i livelli sierici di Vit D_3 influenzerebbero l'omeostasi del comparto T e le caratteristiche di homing. Ma dato che i livelli di Vit D_3 possono dipendere da altri fattori, che potrebbero dipendere in parte da variazioni stagionali (come alcuni ormoni e corticosteroidi), saranno necessarie ulteriori indagini e verifiche per quali di questi fattori abbia in definitiva un ruolo sull'omeostasi T.

Daniela Fenoglio
daniela.fenoglio@unige.it

Viaggiando per convegni

a cura del "Viaggiatore"

EREMO SS. SALVATORE AI CAMALDOLI IN NAPOLI

Suore dell'Ordine di S. Brigida

Siamo tornati viaggiando per convegni o meglio per il Consiglio Scientifico della prossima Scuola Nazionale di Citometria e per il Consiglio Direttivo sulla meravigliosa collina, che ha già ospitato, in diverse occasioni, gli Amici e Colleghi del GIC: l'Eremo SS. Salvatore ai Camaldoli in Napoli; fondato nel 1585, la struttura si erge sulla omonima collina dei Camaldoli e si affaccia tra il Golfo di Napoli ed i "fumanti" Campi Flegrei, da Capri e Punta Campanella, fino a Capo Miseno e poi a Procida e poi a Ischia; nelle giornate di tramontana si può scorgere persino Ventotene. Il complesso monastico rispecchia i canoni dell'architettura cinquecentesca del tardo rinascimento campano; è stato sede, per 400 anni, dei benemeriti Monaci Camaldolesi, che con la loro vita eremitica e cenobitica, hanno dato al luogo un'impronta ascetica, mistica e serena, che si avverte ancora oggi. Le Suore dell'Ordine di S. Brigida, che hanno la loro casa madre nella bellissima piazza Farnese di Roma, sono impegnate principalmente nell'Ecumenismo, custodiscono e curano l'Eremo dopo che gli ultimi Monaci si sono trasferiti alla Casa Madre di Camaldoli in Toscana. L'Eremo, le sue mura, i viali, i giardini, la sua aria, sono permeati dal sereno fascino germogliato dalla fusione della bellezza austera del convento camaldolese, con la cura, squisitamente femminile, che vi dedicano le Suore Brigidine.

L'antica foresteria principale offre stanze ampie e confortevoli e particolarmente curate, mentre hanno una specifica e affascinante personalità, le "celle a schiera" dei monaci, che si affacciano su di un proprio piccolo giardino, ognuno diverso dall'altro, per le piante ed i fiori, che vi prosperano e ognuna con il suo grazioso pozzo/cisterna in pietra. Il lungo viale che costeggia queste antesignane delle villette a schiera, confina sull'altro lato con l'orto, ricco di tutti gli ortaggi di stagione, affidato alle cure, sagge di antica sapienza tramandate tra le generazioni, di Mario, amabile e solare persona che ha profonde radici nella collina dei Camaldoli; il viale si conclude con un terrazzo paronamico "mozza fiato"! Non mancate di visitare la Chiesa barocca, ha dipinti e affreschi di importanti pittori del XVII° secolo, come Luca Giordano, Massimo Stanzione, Andrea Mozzilli e Federico Barocci.

Siamo sicuri che la Madre Superiore Suor Fabia, la sua più stretta collaboratrice Suor Anita e tutte le Consorelle, accoglieranno sempre con cordialissima semplicità gli Amici e Colleghi del GIC che, per lavoro o per vacanza, trascorreranno qualche giorno a Napoli o nei suoi dintorni, anche solo per una visita o meglio ancora per una gradevolissima e serena pausa nel nostro viaggiare……

EREMO SS. Salvatore - "Suore di Santa Brigida" - Via dell'Eremo 87, Camaldoli, 80131 Napoli
Tel 081 5872519 / 5875807, Fax 081 5876819 –
e-mail: eremo.camaldoli@libero.it
http://www.brigidine.org/brigidineorg/default.aspx?idt=146

IL nuovo riferimento per la Clinica

Preparatore FP1000

Modulab™

nizon32

Kaluza™

I.C.S.
Internet
Cytometry Support

La gamma di soluzioni per la clinica offerta da Instrumentation Laboratory è ampia e diversificata, adatta ad ogni carico e tipologia di flusso di lavoro, pensata per risolvere i bisogni di ogni laboratorio.
Le soluzioni si basano sui citofluorimetri CE-IVD Beckman Coulter FC500 e NAVIOS, sistemi dalle prestazioni senza uguali. Gli analizzatori vengono affiancati dai preparatori PrePlusII e FP1000 per rendere automatico il flusso di lavoro e possono essere interfacciati bidirezionalmente al software MODULAB, gestionale di laboratorio e di citometria. Inoltre al sistema può essere aggiunto il nuovo lavatore di campioni cellulari nizon32. Completano l'offerta un ampio catalogo di reattivi e KALUZA, software di analisi potente, innovativo e di facile utilizzo. Per avere uno specialista sempre al vostro fianco, scegliete infine il servizio I.C.S. (Internet Cytometry Support).

Oggi la clinica in citometria è facile, veloce e di qualità certificata!

Scoprite tutte le novità e i dettagli nel sito www.il-italia.it

Instrumentation Laboratory

BECKMAN COULTER

Partners for Excellence