

## DISTACCO CELLULARE

### Matrici extracellulari (ECM)

Le cellule crescono molto bene *in vivo* nei tessuti o ancorate ad una matrice extracellulare (ECM). Le cellule adese sono disposte normalmente in matrici tridimensionali o su superfici in sistemi bidimensionali. Le ECM influiscono su diverse proprietà cellulari: ad esempio sulla capacità legante dei recettori, sulla regolazione della crescita, sui legami delle proteine, sull'inibizione degli enzimi proteolitici. In ciascun organismo vivente molte molecole sono note e definite e circa 80 differenti tipi sono stati caratterizzati. Gli effetti delle ECM sulla vitalità e sul metabolismo cellulare sono svariati ed includono: adesione, angiogenesi, apoptosi, differenziazione, embriogenesi, regolazione genica, risposta immunitaria, migrazione cellulare, mitosi, polarità, induzione e trasferimento del segnale.

E' difficile riprodurre *in vitro* una ECM naturale poiché ciascuna matrice è costituita da diversi componenti indipendenti.

Nei sistemi di cellule in coltura normalmente solo pochi prodotti giocano un ruolo dominante ed importante: per esempio il collagene, la laminina, la fibronectina e, di recente, la pronectina, prodotta con l'ingegneria genetica. Ciascuna molecola ha i suoi specifici vantaggi su specifiche cellule, rispetto alle altre.

Le superfici delle piastre o delle fiasche per tessutocoltura possono essere trattate con una singola sostanza o con una combinazione di queste molecole. L'attacco alla ECM facilita la crescita cellulare e lo sviluppo di strutture tridimensionali.

### Distacco

*In vivo*, per favorire il distacco dalle ECM sono rilasciati dalle cellule degli enzimi specifici. Il distacco dalle ECM è necessario durante i processi mitotici, il rigetto di tessuti artificiali o estranei all'organismo. Gli enzimi che intervengono in questi processi sono ad esempio la ialuronidasi, la collagenasi, l'elastasi.

Anche *in vitro* il distacco cellulare dalle ECM è ottenuto preferenzialmente per via enzimatica. Le ragioni per favorire il distacco dalle matrici sono più spesso il trasferimento delle cellule da un terreno ad un altro o la loro raccolta.

Allo scopo possono essere usati diversi enzimi, in funzione della linea cellulare impiegata o dell'applicazione voluta. Di seguito è riportato un elenco di enzimi litici, con attività progressivamente decrescente nei confronti del distacco cellulare: tripsina, papaina, elastasi, accutasi, ialuronidasi, collagenasi 2, collagenasi 1, collagenasi 4, collagenasi 3, desossiribonucleasi.

La tripsina è l'enzima più frequentemente impiegato per il distacco rapido delle cellule dalle superfici o dalle loro ECM. I vantaggi sono maggiori degli svantaggi indotti dallo stress prodotto sulle cellule.

La collagenasi è utile per le cellule sensibili ed è impiegata soprattutto per la digestione del tessuto connettivo. L'enzima più idoneo tra le varie collagenasi deve essere determinato sperimentalmente su ciascun tipo cellulare.

L'Accutase<sup>TM</sup> è un nuovo enzima con attività digestiva ridotta e debole e che si inattiva spontaneamente dopo il distacco cellulare. E' impiegato per diverse applicazioni: per cellule sensibili, per lo studio delle superfici cellulari (interazioni cellula-cellula, analisi FACS).

In piastra, le cellule aderenti si sviluppano in monostrato, fino a che si raggiunge la massima densità (confluenza). Le cellule trasformate possono crescere oltre la confluenza anche se questo è spesso un fenomeno indesiderato. Quando le cellule hanno raggiunto la massima densità esse devono essere divise e trasferite in un nuovo terreno.

### Distacco delle cellule

- Tripsinizzazione
- Uso della collagenasi
- Trattamento con Accutase<sup>TM</sup>
- Procedura "Shake off"
- Rimozione dal substrato

Dovranno essere applicati, per ciascun tipo cellulare, condizioni sperimentali valutate preventivamente. Di seguito sono descritte alcune procedure generali, applicabili alle linee cellulari standard

### Tripsinizzazione con EDTA

(REF L11-004 / L11-660)

- Scaldare la soluzione di tripsina a 37°C
- Rimuovere il terreno

- Lavare le cellule con PBS (REF H15-002)
- Decantare la soluzione PBS
- Aggiungere 5ml/75cm<sup>2</sup> di Trypsin EDTA
- Incubare 3-5 min in incubatore
- Rimuovere le cellule in sospensione e centrifugare
- Lavare 3 volte con PBS
- Trasferire un'aliquota di cellule in un nuovo terreno

### Trattamento con Collagenasi

(REF K01-040-1/-2/-3/-4)

La collagenasi è generalmente impiegata per la preparazione di cellule primarie ma anche per la sub-coltura di cellule sensibili.

Le concentrazioni d'uso sono nel range di 0,1-1% e variano in funzione del tipo cellulare. Il siero non può bloccare l'attività della collagenasi quindi è necessario centrifugare e lavare immediatamente le cellule dopo il distacco. Una precisa quantità di collagenasi (in funzione del tipo cellulare) è indispensabile per ottenere risultati ottimali

### Trattamento con Accutase™

Accutase™ (L11-007) è l'enzima più debole per il distacco cellulare, che avviene con lentezza, senza influenzare gli epitomi di superficie. Nel passaggio nel nuovo terreno di coltura, l'attacco alle ECM viene drasticamente aumentato.

- Scaldare l'Accutase™ a 37°C
- Rimuovere il terreno
- Lavare con PBS (H5-002)
- Decantare la soluzione di lavaggio
- Aggiungere 5 ml di Accutase™ per 75cm<sup>2</sup> di superficie di coltura
- Incubare per 10-45 min a 37°C
- Contare le cellule e trasferirne un'aliquota in un nuovo terreno.

Non è raccomandabile né necessaria l'inattivazione dell'Accutase™ poiché si auto-digerisce.

### Cellule in sospensione

La sub-coltura di cellule in sospensione, che spesso sono cellule trasformate, è più facile di quella delle cellule adese ad una matrice. I passaggi e le diluizioni possono essere fatti per centrifugazione, lavaggio e aliquotazione.

Un problema ricorrente nel conteggio delle cellule può essere la loro aggregazione. Dopo la morte cellulare viene rilasciato DNA e RNA; quest'ultimo degrada rapidamente mentre il DNA favorisce l'adesione cellulare influenzando notevolmente il metabolismo.

### Trattamento con AccuMax™

Accumax™ (L11-008) agisce con efficacia contro l'aggregazione cellulare. Il conteggio delle cellule può essere fatto secondo la seguente procedura:

- Lavare il pellet cellulare con PBS (H15-002) e centrifugare
- Rimuovere il tampone di lavaggio
- Aggiungere circa 1 ml di AccuMax™ e 1 ml di PBS (H15-002)
- Incubare per 5 minuti a 37°C
- Contare le cellule nell'apposita camera.