

AISF-BIOREPOSITORY

1. Introduzione e linee di utilizzo

Le biobanche che contengono campioni biologici umani come tessuti, sangue o fluidi corporei ed anche le informazioni cliniche correlate, sono delle risorse essenziali per capire la funzione e il significato clinico dei geni umani e degli agenti patogeni. Grandi raccolte di campioni biologici permettono di interpretare la grande variabilità delle malattie e delle risposte ai farmaci fornendo basi essenziali per l'avanzamento della medicina individualizzata. Lo sviluppo di una biobanca nazionale governata da AISF è una priorità strategica della nostra associazione, non solo per rispondere alla domanda emergente di tale risorsa, ma anche per incrementare l'efficacia dell'analisi genomica nella pratica medica, ottimizzando così i costi delle ricerche.

Il Biorepository o Bio-banca AISF vuole rispondere alle necessità degli studi in Epatologia per i principali temi di ricerca. Il biorepository sarà quindi costruito con l'obiettivo di rispondere a 5 principali temi di studio:

1. HBV, 2. HCV, 3. Tumori primitivi epatici, 4. Steatoepatite non alcolica (NASH), 5. Malattie epatiche rare.

Per quanto riguarda l'infezione da virus epatitici B e C, la raccolta di campioni ematici con le rispettive informazioni cliniche, virologiche da soggetti con epatiti acute, croniche, non trattati o sottoposti a terapie antivirali, rappresenta già una prassi ben consolidata nel tempo. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, la raccolta è limitata per quanto concerne il numero di campioni e le situazioni clinico-virologiche affrontate a fronte di sempre più complessi quesiti scientifici. Sarà possibile rispondere a tali quesiti solo con ampi database clinico-virologici. Grazie all'elevato grado di caratterizzazione che è ormai routinariamente disponibile (viremia, genotipi, resistenze farmacologiche etc.), un biorepository nazionale rappresenterà un database d'informazioni cliniche, farmacologiche, virologiche e di campioni biologici per gli approfondimenti scientifici su casistiche selezionate di pazienti.

Anche per i tumori primitivi del fegato e per la steatoepatite non alcolica, le informazioni cliniche, biochimiche, radiologiche e anatomo-patologiche rappresenteranno una parte della caratterizzazione dei campioni raccolti cui si aggiungeranno ulteriori informazioni molecolari con diversi gradi di approfondimento genetico-molecolare a seconda delle diverse patologie. L'obiettivo è di

raccogliere tessuti associati a un elevato numero d'informazioni a tutti i livelli, punto di partenza per approfondimenti scientifici con ambiziosi obiettivi di ricerca come l'identificazione di biomarcatori diagnostici, prognostici, di farmacogenomica, oltre a rispondere a quesiti della scienza di base. Per le malattie rare, che per definizione hanno una bassa prevalenza (< 1 caso ogni 2.000 abitanti secondo la definizione adottata dalla Comunità Europea), un sistema che ne consente la centralizzazione e quindi la disponibilità di un numero adeguato di campioni biologici, sarà uno strumento prezioso che darà la possibilità di effettuare studi sia clinico-epidemiologici che di ricerca di base, per meglio comprendere lo sviluppo morfologico, strutturale e funzionale del fegato e delle vie biliari e il ruolo delle vie di signaling cosiddette "morfogenetiche". Inoltre si potrà implementare lo studio della patogenesi molecolare di malattie come l'emocromatosi, la malattia di Wilson, la colangiopatia da fibrosi cistica, la fibrosi epatica congenita e le colestasi intraepatiche familiari. Infine è da tenere presente che per certi obiettivi, tessuti epatici di tumori o di malattie rare, se adeguatamente caratterizzati dal punto di vista bio-molecolare, possono rappresentare importanti strumenti di ricerca scientifica anche se disponibili in numero limitato.

Linee di utilizzo

Il Biorepository di AISF vuole essere uno strumento a disposizione dei soci AISF che potranno essere fornitori di casi e fruitori di materiali biologici e di dati clinico-biologici.

L'obiettivo è di rendere disponibile il database informatico e i tessuti raccolti a qualunque socio che ne farà richiesta attraverso un dichiarato e dettagliato piano d'utilizzo scientifico tramite la sottomissione di progetti come sotto indicato.

AISF è il fondatore del Biorepository che è governato da un Consiglio della Biobanca garante dell'etica e responsabile delle linee d'indirizzo generale e da un Comitato Tecnico-Scientifico responsabile della selezione dei progetti e della proprietà intellettuale.

L'obiettivo unico del Biorepository è lo sviluppo di progetti scientifici indipendenti nell'ambito dei 5 principali temi di studio.

Il Biorepository non può essere utilizzato con scopi diagnostici, non può essere messo a disposizione delle forze dell'ordine, magistratura e in genere delle autorità inquirenti; non può essere messo a disposizione di altri Enti pubblici o privati con scopi commerciali, non può essere sfruttato a scopo pubblicitario o d'immagine con secondi fini al di fuori della ricerca e della promozione della ricerca in Epatologia.

Il Biorepository AISF viene gestito attraverso due organismi, il Consiglio della Biobanca e il Comitato Tecnico scientifico, la cui composizione ed i loro compiti sono qui riportati.

Il Consiglio della Biobanca è composto da tre membri che restano in carica per tre anni. I membri sono costituiti da 1 dei 2 membri eletti nel Comitato Coordinatore AISF lo stesso anno in cui entra a far parte del Consiglio e i restanti due membri nominati dal Comitato Coordinatore AISF, scelti fra soci in regola con le quote associative. Al fine di una continuità d'indirizzo della Biobanca, quando a regime, ogni anno sarà sostituito un solo membro del Consiglio. A tal fine i due membri nominati dal Comitato Coordinatore AISF al momento della prima costituzione resteranno in carica il primo un solo anno ed il secondo due anni.

Il Consiglio ha come compiti principali di:

- supervisionare sul rispetto delle regole etiche enunciate in questo documento e sul rispetto della legislazione vigente,
- promuovere e gestire i rapporti di collaborazione con altri Enti pubblici e privati, che non potranno avere accesso al materiale e alle informazioni sui singoli casi raccolti ma collaborare con la Biobanca sul piano scientifico e progettuale,
- promuovere la partecipazione dei soci AISF alla Biobanca,
- discutere, programmare e definire con il Comitato AISF i costi di costituzione, gestione, mantenimento e utilizzo della Biobanca.
- Identificare con il Comitato AISF strategie di finanziamento della Biobanca

Il Comitato Tecnico Scientifico della Biobanca è composto da 6 membri che restano in carica per 4 anni. I membri sono costituiti da 1 dei 2 membri eletti nel Comitato Coordinatore che non assume l'incarico di far parte del Consiglio della Biobanca, e i restanti 5 nominati ogni 4 anni dal Comitato Coordinatore AISF fra i soci in regola con le quote associative. Il membro che fa parte del Comitato Coordinatore sarà rinnovato ogni 3 anni invece che 4.

Il Comitato Tecnico Scientifico è l'organo di consulenza e di supporto dell'attività della biobanca per gli aspetti tecnico-scientifici. La Commissione, per specifiche problematiche può avvalersi del supporto di esperti esterni.

I compiti principali del *Comitato Tecnico Scientifico* (CTS) sono:

- deliberare sulle priorità scientifiche,

- definire i criteri minimi, in termini di strumenti di archiviazione dei campioni biologici, dei laboratori partecipanti. Il laboratorio/centro partecipante al 1° campione raccolto farà domanda di accreditamento al CTS tramite compilazione e invio di formulario generato dalla stessa,
- monitorare sulla corretta applicazione delle procedure standard operative per il campionamento, stoccaggio, archiviazione e raccolta delle informazioni clinico-biologiche in una CRF dedicata,
- indire Bandi con scadenza annuale per la sottomissione di progetti di ricerca nell'ambito dei 5 principali temi di studio che prevedono l'utilizzo del materiale e/o delle informazioni archiviate,
- raccogliere e valutare in modo competitivo i progetti di ricerca sottomessi, che prima della definitiva approvazione saranno condivisi con il Comitato Coordinatore AISF deputato a ratificare la decisione del CTS,
- decidere in merito alla proprietà intellettuale dei dati tenendo conto del ruolo dei promotori e coordinatori degli studi proposti e dei centri maggiori contribuenti dei campioni biologici e delle informazioni clinico-biologiche di quel specifico progetto. In particolare ogni pubblicazione scientifica porterà la dizione: "On behalf of A.I.S.F. Biorepository" e tutti i centri che hanno raccolto campioni utilizzati saranno di seguito listati,
- promuovere e monitorare la pubblicazione dei risultati scientifici su riviste bio-mediche peer reviewed, oltre a svolgere un ruolo consultivo sulle pubblicazioni prima della loro sottomissione a riviste scientifiche,
- dare supporto al Consiglio per gli aspetti scientifici inerenti i rapporti di collaborazione con altri enti pubblici e privati,
- identificare e promuovere eventuali altri temi di studio,
- Aggiornare i partecipanti sullo stato della biobanca (campioni raccolti, progetti in corso) tramite una informativa con cadenza almeno annuale.

2. Aspetti Etici

Prendendo come riferimento il report sulle linee guida relative gli aspetti etici della “Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI), sono presi in considerazione i seguenti punti:

1. Definizione di Biobanca
2. Consenso Informato
3. Trattamento dati personali

1. Definizione di Biobanca

Si definisce Biobanca la raccolta di materiale biologico umano associato a dati e informazioni personali dei donatori.

2. Consenso Informato

In conformità ai principi etici, alle norme giuridiche e ai codici di condotta vigenti in ambito nazionale e sovranazionale, la donazione del materiale biologico è volontaria, libera e non remunerata.

- Il materiale biologico è prelevato sulla base e nel rispetto del consenso espresso, libero e informato del donatore.
- Ai fini dell’acquisizione del consenso al donatore deve essere fornita adeguata informazione sui seguenti aspetti:
 - la donazione ha finalità altruistiche e di solidarietà;
 - l’utilizzo del materiale biologico a fini di ricerca avverrà in relazione a specifici obiettivi di ricerca, sulla base di protocolli soggetti a valutazione preventiva da parte del Comitato Tecnico Scientifico della Biobanca AISF;
 - in considerazione delle finalità della donazione, il consenso volontariamente e liberamente espresso è revocabile.
- All’acquisizione del consenso alla donazione di materiale biologico da vivente o da cadavere si applicano le norme e i principi vigenti in materia.
- Il donatore ha diritto di non autorizzare il trattamento dei suoi dati personali e di revocare l'autorizzazione concessa o comunque di chiedere che i suoi dati personali siano resi anonimi.

- Nell'elaborazione dei modelli per l'informazione al donatore e per l'acquisizione del consenso alla donazione di materiale biologico la Biobanca osserva le norme e i principi generali vigenti in materia.
- Tali modelli sono utilizzati dagli utenti della Biobanca che possono apportare le integrazioni necessarie in relazione alle specificità di settore.

L'allegato 1 riporta un esempio di modello di consenso informato che può essere adottato dalla Biobanca AISF.

Il materiale biologico depositato nella biobanca sarà utilizzato per fini di ricerca, previo ottenimento del consenso informato del paziente. Il consenso informato è ottenuto dal personale clinico delle Unità Operative o dei Servizi Diagnostici interessati.

La Biobanca non acquisisce la proprietà dei campioni biologici che conserva, ma s'impegna a custodirli.

Il regime giuridico dei campioni è regolato dalle disposizioni vigenti in materia.

3) Trattamento dei dati personali

I dati personali, compresi i dati sensibili, riguardanti i donatori e, per i casi in cui siano coinvolte, le rispettive famiglie, sono trattati mediante procedure e strumenti idonei a garantire il rispetto della riservatezza, in conformità a quanto previsto dalle norme vigenti in campo nazionale e sovranazionale. Ad esempio dati e campioni biologici devono essere anonimi e codificati (numero o codice) in modo da non riportare alcun dato identificativo personale.

3. Raccolta, Processazione e Conservazione dei Campioni Biologici

La Biobanca prevede la raccolta e la conservazione di materiale biologico di diverso tipo. In questo paragrafo vengono fornite le raccomandazioni generali per la raccolta, processazione e conservazione di: sangue intero, siero, plasma, cellule ematiche, tessuto epatico e cellule epatiche parenchimali e non parenchimali. Le metodiche da utilizzare per la “processazione” dei diversi campioni biologici sono fornite come materiale allegato e sono in accordo con quelle presentate nel “Common Minimum Technical Standards and Protocols for Biological Resource Centres dedicated to Cancer Research - IARC recommendations and protocols for biobanking, version 1 (2007) “.

Campionamento previsto

La raccolta di campioni biologici è diversa a seconda della tematica di studio prevista dalla biobanca. Le principali tematiche di studio sono cinque: 1. HBV, 2. HCV, 3. Tumori primitivi epatici, 4. Steatoepatite non alcolica (NASH), 5. Malattie epatiche rare.

- Per studiare le tematiche 1. e 2., il campionamento previsto consiste in: 2 aliquote da 1,5 ml di plasma, 3 aliquote da 1 ml di siero e 3 aliquote da 1 ml di sangue intero da raccogliere in provette sterili con tappo a vite. E' inoltre auspicabile, ma non necessario, il campionamento di tessuto epatico da congelare a -80 °C in RNAlater, a secco o incluso in OCT e di linfomonociti periferici derivati da almeno 20 ml di sangue (Tabella 1). La raccolta di aliquote da 1,5 ml di plasma si rende necessaria in quanto le attuali e più comuni metodiche di quantizzazione in Real Time PCR degli acidi nucleici dei virus epatitici vengono eseguite su un volume di 1,2 ml di plasma.

- Per le altre tematiche di studio, il campionamento previsto consiste in: 2 aliquote da 1,5 ml di plasma, 3 aliquote da 1 ml di siero, 3 aliquote da 1 ml di sangue intero, 1 campione di tessuto epatico se da agobiopsia, o 2 campioni se da resezione chirurgica, da congelare a -80 °C in RNAlater o a secco. E' inoltre auspicabile, ma non necessario, il campionamento di tessuto epatico in OCT e di linfomonociti periferici derivati da almeno 20 ml di sangue (Tabella 2).




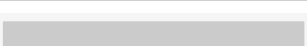


Per lo studio dei tumori primitivi del fegato, i campioni di tessuto da congelare dovranno derivare sia dalla regione epatica tumorale che quella non tumorale.

Per le malattie epatiche rare con coinvolgimento dell'epitelio biliare (colangiopatie), oltre al campionamento di siero, plasma, sangue intero e tessuto epatico derivante da agobiopsia effettuata a scopo diagnostico, è anche prevista la conservazione di colangiociti qualora vi fosse disponibilità di tessuto epatico derivante da procedure terapeutiche di tipo chirurgico (come la resezione epatica o il trapianto di fegato) . Per poter effettuare l'isolamento di colangiociti si rende infatti necessaria la disponibilità di almeno 20-30 g di tessuto epatico che, peraltro, dovrà essere tenuto a fresco dal

momento della procedura chirurgica sino al momento in cui verrà effettuato l'isolamento dei colangiociti. Quest'ultimo dovrà avvenire entro le 24 hrs dall'intervento chirurgico (Tabella 3) cui seguirà il congelamento dopo i primi passaggi in-vitro in modo da preservare il più possibile le caratteristiche fenotipiche.

Infine per tutti gli studi è auspicabile che ogni centro conservi - o abbia accesso a - un blocchetto o almeno 5 sezioni di tessuto epatico da 10 mµ di spessore, inclusi in paraffina.

Tabella 1. Campionamento previsto per gli studi (1) e (2).

<i>Tipo di campione biologico</i>	<i>Quantità minima</i>	<i>Tipo di richiesta*</i>
§Plasma	2 aliquote da 1,5 ml	
§Siero	3 aliquote da 1 ml	
§Sangue intero	3 aliquote da 1 ml	
Tessuto epatico da agobiopsia	Un frammento di almeno 0,5 cm di lunghezza	
Blocchetto o sezioni di tessuto epatico incluse in paraffina	Un blocchetto o 5 sezioni da 10 mµ	
Linfomonociti	Aliquote derivate da almeno 20 ml di sangue	

§ Da conservare in provette di plastica sterili con tappo a vite, possibilmente da 2 ml.

* Obbligatoria: 

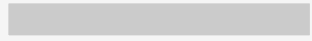
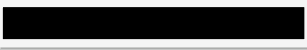



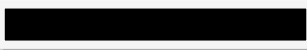
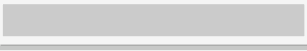

* Auspicabile: 

Tabella 2. Campionamento minimo per gli studi sui tumori primitivi del fegato (3)



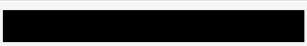



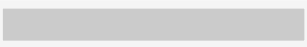
<i>Tipo di campione biologico</i>	<i>Quantità minima</i>	<i>Tipo di richiesta*</i>
§ Plasma	2 aliquote da 1,5 ml	
§ Siero	3 aliquote da 1 ml	
§ Sangue intero	3 aliquote da 1 ml	
Tessuto epatico tumorale e non tumorale da agobiopsia	Un frammento di t. tumorale ed uno di t. non tumorale di almeno 0,5 cm di lunghezza	
Tessuto epatico tumorale e non tumorale da resezione chirurgica	2 campioni di t. tumorale e 2 di t. non tumorale, ciascuno di almeno 0,5 cm per lato	
Blocchetto o sezioni di tessuto epatico incluse in paraffina	Un blocchetto o 5 sezioni da 10 mμ	
Linfomonociti	Aliquote derivate da almeno 20 ml di sangue	

§ Da conservare in provette di plastica sterili con tappo a vite, possibilmente da 2 ml.

* Obbligatoria: 

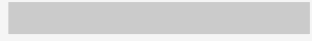
* Auspicabile: 

Tabella 3. Campionamento minimo per gli studi sulle malattie rare (4)

<i>Tipo di campione biologico</i>	<i>Quantità minima</i>	<i>Tipo di richiesta*</i>
§Plasma	2 aliquote da 1,5 ml	
§Siero	3 aliquote da 1 ml	
§Sangue intero	3 aliquote da 1 ml	
Tessuto epatico da agobiopsia	Un frammento di t. tumorale ed uno di t. non tumorale di almeno 0,5 cm di lunghezza	
Tessuto epatico da resezione chirurgica/ trapianto	30 g di tessuto fresco in 2 provette universali (Falcon) da 50 ml conservati con Fisiologica (o Belzer o PBS) per non più di 24 hrs a 4°C	
Blocchetto o fette di tessuto epatico fissati in paraffina	Un blocchetto o 5 sezioni da 10 µm	
Linfomonociti	Aliquote derivate da almeno 20 ml di sangue	

§ Da conservare in provette di plastica sterili con tappo a vite, possibilmente da 2 ml.

* Obbligatoria: 

* Auspicabile: 

Modalità di Etichettatura dei Campioni Biologici

Ciascun campione deve essere etichettato utilizzando materiale resistente al ghiaccio secco ed all'azoto liquido. Tutti i campioni che entrano nella Biobanca AISF dovranno essere codificati in maniera univoca secondo uno schema concordato all'atto di fondazione della Biobanca. Di seguito è riportato un esempio di possibile etichettatura dei campioni:

BANCA/anno/Protocollo di studio/N. progressivo pz/lettera per id campione

MI/2009/HCC/10/TT Milano/2009/protocollo HCC/paz 10/tessuto tumorale

TS = tessuto sano
TP = tessuto patologico
TPT = tessuto peritumorale
TT = tessuto tumorale
SP = sangue periferico
S = siero
P = plasma
BC = buffy-coat
L = linfociti
BEC = cellule epiteliali biliari
EP = epatociti
CM = cellule mesenchimali
CE = cellule endoteliali
DNA
RNA
.....

Per una dettagliata descrizione delle Procedure Operative Standard per la Raccolta, Processazione e Conservazione dei Campioni di Tessuto, siero e sangue si rimanda agli allegati (Allegato 2, 3, 4, 5)

4. Caratterizzazione dei campioni raccolti per: HBV, HCV, Tumori primitivi, Steato epatite non alcolica (NASH), Malattie epatiche rare

4.1 HBV – HDV – HCV

L'annotazione clinico-virologica dei campioni da pazienti con infezione/malattia epatica HBV, HDV e HCV non presenta, in considerazione della qualità e quantità di dati per i quali è consolidata nella pratica clinica una raccolta sistematica, particolari criticità. Aspetti importanti che meritano attenzione nella costruzione di un algoritmo di annotazione per questa tipologia di campioni biologici riguardano: a) la “qualità” della descrizione dei reperti anatomopatologici (quando disponibili); b) la modalità e cadenza di raccolta dei dati della fibro-elastografia epatica; c) la omogeneizzazione della raccolta dei parametri metabolici necessari per gli eventuali studi volti a caratterizzare le interazioni tra infezioni virali, steatosi, steato-epatite e sindrome metabolica.

In una prospettiva non lontana, grazie anche alla recente disponibilità di metodiche dai costi relativamente contenuti dal punto di vista dell'esame, anche se prevedono l'uso di piattaforme ad alta tecnologia necessariamente centralizzate in laboratori di riferimento, l'annotazione dei campioni della biobanca per quanto riguarda i pazienti con infezioni/epatopatie correlate ai virus potrebbe includere l'analisi di alcuni polimorfismi genetici capaci di predire la risoluzione spontanea e la risposta alla terapia di combinazione con PEG-IFN e ribavirina (pazienti HCV) (Ge, 2009; Thomas, 2009) e la predisposizione all'accumulo più o meno accelerato di fibrosi (HBV e HCV) (Huang, 2007; Marcolongo 2009).

Queste le principali annotazioni per i campioni biologici che saranno raccolti, una più dettagliata elencazione dei parametri clinici e di laboratorio è riportata nella specifica CRF.

Caratteristiche clinico-epidemiologiche:	BMI, Età, Sesso, Razza
Virologia	- HBV (HBsAg, HBeAg/anti-HBe, HBV-DNA) - HCV (anti-HCV, HCV-RNA +) - coinfezione HBV/HDV, HBV/HCV, HBV/HDV/HCV, HIV - OBI in HCV (facoltativo)
Caratteristiche della malattia epatica Indagini strumentali:	Valutazione non invasiva della fibrosi (Fibroscan) Presenza di cirrosi (Child-Pugh, MELD) Steatosi (Ecografia)

	Biopsia (Descrizione, scores)
Storia Terapeutica:	Trattamenti, Risposta al trattamento interferonico (per HCV RVR, EVR, SVR), antivirale - Resistenze farmacologiche

4.2 HCC

Nel caso dell'HCC l' "annotazione" dei campioni deve prevedere sia parametri demografici e clinici (vedi CRF) che informazioni essenziali sul piano anatomopatologico, biologico e molecolare. Le modalità diagnostiche e di allocazione al trattamento previste dalle correnti linee guida internazionali e nazionali pongono tuttavia alcune limitazioni ad una corretta e completa annotazione dei campioni per finalità di ricerca in quanto non prevedono l'utilizzazione universale della biopsia epatica e/o dell'analisi istopatologica. E' evidente quindi la necessità di differenziare nell'ambito della Biobanca due livelli di "annotazione" dei campioni all'"entrata" che prefigurano anche diverse allocazioni dei campioni in studi di disegno appropriato a seconda dell'acquisizione e disponibilità di dati istopatologici durante l'iter-diagnostico/terapeutico. E' importante sottolineare come nei fatti la previsione della disponibilità di "annotazioni" anatomopatologiche rifletta, in accordo ai criteri diagnostici ed agli interventi terapeutici oggi utilizzati, potenzialmente anche differenze cliniche e biologiche (dimensioni del tumore, numero dei noduli, gravità della malattia epatica). Infine, anche tra i casi in cui viene ad essere effettuata una valutazione istopatologica, l'origine del campione analizzato (pezzo operatorio vs biopsia/ago sottile) inserisce un ulteriore livello di variabilità non solo nella qualità delle informazioni ma anche nella quantità di campione disponibile per ulteriori analisi e per lo stoccaggio nella Biobanca.

Queste le principali annotazioni per i campioni biologici che saranno raccolti, una più dettagliata elencazione dei parametri clinici e di laboratorio è riportata nella specifica CRF.

Caratteristiche clinico-epidemiologiche:	Età, Sesso, Razza
Caratteristiche della malattia epatica	- HBV (HBsAg) - HCV (anti-HCV, HCV-RNA +) - coinfezione HBV/HDV, HBV/HCV, HBV/HDV/HCV, HIV - OBI in HCV (facoltativo) - Presenza di cirrosi

	<ul style="list-style-type: none"> - alfa-feto proteina - Child-Pugh, MELD
Imaging:	<ul style="list-style-type: none"> - Numero e dimensioni dei noduli (TC, RMN) - Localizzazione del(i) noduli - Macro-invasione vascolare - Metastasi a distanza - Numero e dimensioni dei noduli (espianto) (solo in caso di OLT)
Anatomia Patologica	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnosi descrittiva H&E - Edmonson - Micro-invasione vascolare - CK19, CK7 (facoltativo) - CD34 (facoltativo) - HSP70 + GPC3 + GS (facoltativo) - EpCam (facoltativo) - Tessuto peritumorale: displasia, PCNA (facoltativo)
Caratteristiche molecolari	<ul style="list-style-type: none"> - Status p53 (altamente preferibile analisi genetica, vs accumulo p53 in IH) - Mutazioni beta-catenina (facoltativo) - EpCam (facoltativo)
Storia Terapeutica:	Trattamenti: Percutanei, Resezione, Farmaci

L'introduzione delle metodiche di valutazione a livello genomico dei profili di espressione ha reso disponibili alcune "signatures" molecolari che possono essere ricercate in piccolissime quantità di campione (RNA) con metodiche dal costo ragionevole e largamente disponibili (real-time RT-PCR) o a costo estremamente contenuto ma con protocolli di analisi meno diffusi (ibridizzazione liquida). In prospettiva l'annotazione molecolare dei campioni della biobanca potrebbe includere le principali signatures di tipizzazione (G1/G6 Boyault 2007 integrato con Chiang 2008 e Hoshida 2009) e prognostiche (Buendia 2009, Budhu 2008), che potranno essere comprese tra le analisi molecolari da includere negli specifici progetti di ricerca sottomessi al Comitato Tecnico Scientifico della Biobanca.

4.2.1 Colangiocarcinoma (CCA)

A differenza dell'HCC, stante la minore disponibilità di forme curative di trattamento e la ridotta conoscenza in tema di patogenesi molecolare del tumore, l'annotazione dei campioni di CCA deve prevedere essenzialmente, oltre ai parametri demografici e clinici (vedi CRF), informazioni riguardanti: a) la localizzazione del tumore (intraepatico o extraepatico), b) le caratteristiche di "background" del fegato su cui insorge il CCA (normale, colangite sclerosante primitiva, malattie fibropolicistiche, cirrosi di etiologia virale), c) la forma di CCA (nodulare/mass-forming, infiltrante/sclerosante, intraduttale/papillare), d) l'istotipo di CCA (adenocarcinoma, o tipi più rari come: carcinoma squamoso, mucinoso, colangiocellulare, con cellule ad anello con castone, sarcomatoide, "a cellule chiare), e) il tipo di trattamento (resezione o non resezione), f) in caso di resezione, il coinvolgimento dei margini di resezione e l'interessamento linfonodale, g) se non suscettibile di resezione, il grado di estensione loco-regionale e la presenza di metastasi a distanza. Trattandosi di una forma di neoplasia particolarmente aggressiva e tuttora con opzioni di trattamento estremamente limitate, la principale esigenza scientifica è quella di identificare possibili fattori predittivi di outcome, anche in prospettiva di allargare la scelta di forme di trattamento potenzialmente curative come il trapianto di fegato.

4.3 Steatosi e steatoepatite non alcolica

La steatosi (NAFLD) e la steatoepatite (NASH) non alcolica rappresentano verosimilmente la causa più frequente di epatopatia cronica, data la loro diffusione nella popolazione generale (25% per la NAFLD) e l'associazione con le componenti della sindrome metabolica come l'obesità, le dislipidemie, il diabete, l'ipertensione arteriosa. La diagnosi di NAFLD e NASH è una diagnosi di esclusione, che può essere posta dopo aver escluso le altre forme di epatopatie croniche ed un eccessivo consumo di alcol (40 gr/die o 3 drinks/die). Di fondamentale importanza è poi la diagnosi differenziale, che può essere posta solo su base istologica, tra NAFLD e NASH. Diversi studi epidemiologici, sia italiani che anglosassoni, hanno infatti dimostrato che la NAFLD raramente evolve verso quadri clinicamente significativi di danno epatico, ma i pazienti con questa condizione sembrano essere caratterizzati da una maggiore incidenza di malattie cardiovascolari. Al contrario, i pazienti con NASH evolvono con relativa rapidità (verosimilmente in meno di 5 anni) verso quadri di fibrosi avanzata e sembrerebbero sviluppare HCC (almeno una parte dei pazienti) in assenza di cirrosi conclamata.

La diagnosi di NAFLD e NASH deve essere posta seguendo le linee guida AISF recentemente pubblicate (DigLiv Dis 2010; 42: 272–282). La diagnostica differenziale tra NAFLD e NASH deve

essere basata su precisi criteri istologici accompagnati da una adeguata descrizione delle lesioni (Hepatology 2005;41:1313–21). Dato che questa classificazione viene routinariamente eseguita solo in pochi centri, sarà fondamentale poter disporre anche del campione bioptico originariamente processato ed eventualmente anche di blocchetti di paraffina, sia per una revisione che per la successiva integrazione delle informazioni da parte della struttura della Biobanca.

Queste le principali annotazioni per i campioni biologici che saranno raccolti, una più dettagliata elencazione dei parametri clinici e di laboratorio è riportata nella specifica CRF.

Caratteristiche clinico-epidemiologiche:	BMI, Circonferenza vita, Pressione arteriosa, Familiarità per epatopatia cronica criptogenetica diabete, ipertensione, dislipidemie, obesità, malattie cardiovascolari
Caratteristiche della malattia epatica (esclusione di altre cause di epatopatia cronica):	Alcolica: definizione dell'introito alcolico (drinks/die) - Tossica farmacologia - Virali - Emocromatosi - Autoimmune - Wilson - deficit α 1-antitripsina - ormonali (TSH) etc.
Dati di laboratorio specifici:	fegato, assetto lipidico, metabolismo glucidico, etc
Indagini strumentali:	US, Eco-doppler TSA
Biopsia epatica:	diagnosi descrittiva (Score sec. Kleiner et al., Hepatology 2005;41:1313–21) su sezioni di routine (H&E e colorazione tricromica). La descrizione dei parametri istologici sec. Kleiner può essere centralizzata su sezioni di routine.

4.4 Malattie Epatiche Rare

Nel caso delle malattie epatiche rare, la corretta “annotazione” dei campioni clinici inseriti nella Biobanca è essenziale soprattutto per la validazione dei criteri diagnostici, requisito cruciale per poter considerare “adeguato” un campione. Trattandosi di malattie di diagnosi difficile e laboriosa,

la cui origine è spesso genetica, il “golden standard” della diagnosi, ossia il test genetico, è però disponibile solo in casi limitati, e quindi la diagnosi viene effettuata per lo più sulla base di criteri di esclusione. Il problema del riconoscimento di queste malattie è ulteriormente gravato dal fatto che solo ad alcuni centri specialistici viene effettivamente riconosciuta la capacità diagnostica. Pertanto, per rendere più semplice l’impatto con le malattie rare, nel sito web dell’AISF (www.webaisf.org) è disponibile un documento, elaborato nel 2007 da una specifica commissione, dove sono indicati per ogni malattia epatica rara i relativi criteri diagnostici, e offre quindi uno strumento omogeneo di consultazione per il corretto inserimento del campione. Inoltre, data l’importanza dell’esame istologico per la diagnosi di molte di queste malattie, sarà fondamentale poter disporre anche del campione biptico originariamente processato ed eventualmente anche di blocchetti di paraffina, sia per una revisione che per la successiva integrazione delle informazioni da parte della struttura della Biobanca.

Queste le principali annotazioni per i campioni biologici che saranno raccolti, una più dettagliata elencazione dei parametri clinici e di laboratorio è riportata nella specifica CRF.

Caratteristiche clinico-epidemiologiche:	Età, Sesso, Razza, Familiarità (epatopatia, insufficienza renale, diabete, bronchiti ricorrenti, cerebropatie, altro) Farmaci (recenti o in atto al momento del prelievo), BMI
Caratteristiche della malattia epatica - Laboratorio	Esclusione cause virali, Esclusione inappropriato consumo etanologico, Esclusione sindrome plurimetabolica, NOSA (ANA, AMA, ASMA, LKM, ANCA), ferritinemia, cupremia/cupruria, ceruloplasmina, α 1-anti-tripsina, acidi biliari, citolisi/colestasi, test genetico (se eseguito)
Caratteristiche della malattia epatica - Imaging (Eco, TC o RMN)	steatosi, cirrosi - cisti epatiche e/o renali - litiasi intraepatica - vie biliari irregolari/dilatate
EGDs	Ipertensione portale
Biopsia epatica:	- Diagnosi descrittiva (H&E) - Masson tricromica (o Sirius Red)

Anche per le malattie rare, in via teorica un campione può essere “annotato” in modo incompleto dal centro di raccolta (caratteristiche clinico-epidemiologiche, dati di laboratorio, esami radiologici ed endoscopici) e poi completato a cura della struttura della Biobanca. Il campione istologico potrebbe essere oggetto di protocolli di caratterizzazione immunofenotipica più sofisticati (K7 o K19, CD31 o CD34, α 1-anti-tripsina) a cura della struttura della Biobanca.

ALLEGATO 1 Modello di Consenso Informato

Istituto di
Unità Operativa
Dipartimento di

Direttore: Prof.

Consenso informato alla conservazione di campioni biologici in vista di studi futuri

INFORMAZIONE

Gentile Sig.re/Sig.ra,

La informiamo che, se presta il Suo consenso, durante l'intervento chirurgico die/o l'accertamento diagnostico disaranno prelevati alcuni campioni di che verranno conservati presso....., una struttura pubblica per la raccolta di campioni biologici (ad esempio, sangue, cellule, tessuti) con sede presso.....

Modalità di prelievo dei campioni

Tali campioni saranno ricavati dal materiale biologico che residua all'esecuzione dell'intervento o della procedura diagnostica o, qualora necessario, saranno prelevati in aggiunta al materiale biologico rimosso durante l'intervento o la procedura diagnostica.

Tale prelievo non comporterà alcun rischio per la Sua salute.

Finalità e natura degli studi

I campioni prelevati potranno essere utilizzati, in futuro, per compiere indagini di carattere anatomopatologico, molecolare o genetico che riguardano la patologia che ha portato al presente intervento chirurgico o procedura diagnostica. Tali studi saranno finalizzati ad un miglioramento delle metodiche diagnostiche e terapeutiche che riguardano, in particolare, le malattie epatiche. Nel caso di modifiche sostanziali relative alla finalità di studi futuri, Lei sarà ricontattato per una integrazione al presente consenso.

Sviluppi correlati agli studi

I risultati acquisiti dal compimento di tali indagini potranno essere utilizzati, in forma anonima, in pubblicazioni scientifiche. Inoltre essi potranno contribuire allo sviluppo di nuove modalità diagnostico/terapeutiche. Nel rispetto delle normative vigenti i proventi ricavati dallo sviluppo di tali prodotti potranno essere impiegati ad esclusivo beneficio della collettività.

Tutela della riservatezza

I Suoi campioni e i dati personali e clinici ad essi associati verranno trattati dai ricercatori e dal personale incaricato in modo da garantire il rispetto della Sua

riservatezza e potranno essere condivisi, sempre in forma anonima, con altri ricercatori.

Informazioni sui risultati degli studi e su eventuali indagini future

Se lo desidera, potrà ricevere informazioni sull'andamento degli studi che verranno compiuti usando i Suoi campioni e sui risultati ottenuti sino a quel momento.

In futuro i Suoi campioni potranno essere utilizzati per proseguire tali studi o per intraprendere nuove indagini ad essi correlate, senza necessità di chiedere un nuovo consenso.

Revoca del consenso

In qualunque momento e per qualunque motivazione potrà revocare il Suo consenso alla conservazione dei campioni e/o al loro utilizzo e potrà chiedere che i Suoi campioni e i dati clinici e personali ad essi associati siano eliminati. Tali scelte non avranno alcun effetto negativo sulla Sua assistenza medica. Esse, tuttavia, potranno impedire la continuazione degli studi intrapresi o l'avvio di nuovi studi correlati.

CONSENSO

In base alle informazioni che ho ricevuto e avendo avuto la possibilità di chiedere spiegazioni,

ACCONSENTO che:

1. I campioni biologici prelevati siano conservati nelle sedi segnalate.

SI

NO

2. I campioni biologici e i dati personali e clinici ad essi associati siano utilizzati per compiere in futuro indagini finalizzate al miglioramento di metodiche diagnostiche e terapeutiche

SI

NO

3. I campioni e i dati personali e clinici ad essi associati siano inoltre utilizzati per proseguire tali studi e/o compiere nuove indagini ad essi correlate, senza necessità di prestare un nuovo consenso

SI

NO

4. I campioni biologici e i dati personali e clinici ad essi associati vengano utilizzati in forma anonima dai ricercatori e dal personale incaricato e siano condivisi, sempre in forma anonima, con altri ricercatori

SI

NO

5. I risultati acquisiti dal compimento di tali indagini possano essere utilizzati in forma anonima in pubblicazioni scientifiche e/o possano contribuire allo sviluppo di nuove modalità diagnostico/terapeutiche derivanti da tali indagini

SI

NO

DICHIARO di:

6. aver ricevuto informazioni sulla possibilità di revocare il consenso alla conservazione e/o utilizzo dei miei campioni e dei dati ad essi associati in qualunque momento e per qualunque motivazione

SI

NO

7. voler ricevere informazioni sui risultati confermati dagli esami analitici compiuti durante lo svolgimento degli studi e su eventuali nuovi risultati e/o possibilità diagnostiche/terapeutiche derivanti da tali indagini

SI

NO

Data_____

Il

paziente_____

Firma_____

Il presente consenso è stato raccolto da:

Dr _____ Firma_____

Qualifica _____

ALLEGATO 2

Procedure Operative Standard per la Raccolta, Processazione e Conservazione dei Campioni di Tessuto Epatico

Congelamento rapido o *Snap-freezing*

- I frammenti di tessuto (pezzi operatori o campioni bioptici) devono essere congelati entro 1 h dal prelevamento. E' anche possibile conservare campioni fino a 2 h dal momento del prelevamento, ma il ritardo deve essere segnalato nel database al momento della registrazione. Dal momento del prelievo del campione tessutale al momento in cui esso sarà congelato (anche durante l'eventuale trasporto dal luogo del prelevamento alla sede di conservazione) i campioni devono essere posti in contenitori sterili chiusi e tenuti in ghiaccio (i pezzi di tessuto possono essere avvolti in una garza umida di soluzione fisiologica, ma non devono essere immersi in acqua o fisiologica, perché ciò comporterebbe la solubilizzazione di alcuni antigeni extracellulari nel liquido, né – ovviamente – devono essere fissati).
- La dissezione del tessuto deve essere effettuata su una superficie pulita o meglio sterile (es. piastra di Petri) attraverso l'utilizzo di strumentazione sterile (bisturi).
- E' necessario pulire (con alcol ed acqua sterile) o meglio sostituire lo strumento fra la dissezione del tessuto normale e quella del tessuto tumorale di uno stesso campione biologico.
- Campioni tessutali da prelevare e conservare per ciascun caso sono: lesione tumorale (od eventualmente pre-neoplastica) tessuto peri-neoplastico, tessuto normale.
- Se vi è materiale tessutale sufficiente, congelare in doppio i campioni. Ove possibile i frammenti di tessuto da congelare dovrebbero avere dimensioni non inferiori a 0.5 cm³ e di dimensioni adatte ad essere contenute nelle provette da congelamento
- I campioni tessutali non dovrebbero essere congelati direttamente in ghiaccio secco o azoto liquido ma in isopentano freddo*
 - *Mescolare dell'isopentano (2-methyl butano) con azoto liquido o con ghiaccio secco finché la soluzione non diventerà fumosa (a questo punto l'isopentano avrà raggiunto la temperatura di congelamento ottimale per i tessuti).
- Congelare ciascun campione di tessuto ponendolo direttamente nel mezzo di congelamento. Non rimuovere il tessuto dall'isopentano freddo finché il congelamento non sarà completo (in genere sono sufficienti pochi secondi, ovviamente ciò dipende dalle dimensioni del campione). Inserire, quindi, rapidamente il campione in una provetta da congelamento (cryovial) già etichettata.

- I campioni di tessuto congelati devono essere conservati o in un congelatore a -80 °C o in azoto liquido. Per una conservazione superiore ai 5 anni è raccomandato l'utilizzo dell'azoto liquido.
- Registrare i dati concernenti il campione tessutale sia su materiale cartaceo che al computer. Le informazioni minime da inserire riguardano: il numero d'inventario, il posizionamento del campione al momento del congelamento, le caratteristiche istopatologiche del tessuto (sede di prelevamento, se si tratta di tumore, non tumore o lesione pre-neoplastica. Eventuale diagnosi istologica), intervallo di tempo tra il tempo di prelevamento ed il congelamento e la data di congelamento.

Conservazione in RNAlater

L'*RNAlater* stabilizza e preserva l'RNA ed il DNA dei tessuti freschi, pertanto il suo utilizzo elimina la necessità di processare o congelare immediatamente i campioni di tessuto.

- I frammenti di tessuto da immergere nella soluzione acquosa di *RNAlater* devono essere di lunghezza inferiore a 0.5 cm (0.5 g di tessuto richiedono 2.5 ml di *RNAlater*)

I tessuti in *RNAlater* possono essere conservati a 25 °C per una settimana, a 4 °C per un mese o a -20 °C a tempo indefinito.

Conservazione di tessuti in OCT

I tessuti possono essere congelati in OCT per l'esecuzione di fettine istologiche mediante criotomo.

- Coprire con un velo di OCT il fondo di un vassoietto di plastica resistente alle basse temperature;
- Adagiare il campione di tessuto nella vaschetta avendo cura di ricoprirlo completamente con l'OCT;
- Con delle pinzette sufficientemente lunghe immergere il vassoietto con il campione in isopentano freddo o, se non si dispone di isopentano, direttamente in azoto liquido finchè l'OCT non si è solidificato completamente (aspetto bianco opaco)*.
- Trasferire rapidamente il vassoietto con il campione in un congelatore a - 80°C.

*Non far cadere il vassoietto nell'azoto liquido per evitare la formazione di bolle nell' OCT che potrebbero danneggiare il campione. Una volta solidificato l'OCT, si immerge completamente il vassoietto nel liquido di congelamento finchè non si sviluppano più bolle nell'azoto o nell'isopentano.

ALLEGATO 3

Procedure Operative Standard per la Raccolta, Processazione e Conservazione dei Campioni di Sangue

Conservazione di campioni di Plasma

- Utilizzare vacutainer contenenti EDTA o ACD (come anticoagulanti) per il prelievo di sangue.
- Dopo il prelievo invertire la provetta 10 volte per miscelare il sangue con l'anticoagulante.
- Centrifugare i vacutainer (possibilmente 2 vacutainer da 10 ml per ciascun paziente) a 815xg per 10 minuti a 4°C per separare il plasma dalla parte corpuscolate del sangue.
- *Trasferire il plasma in un tubo da 15 ml sterile e centrifugare a 2500xg per 10 minuti a 4 °C
- Aliquotare il plasma (1-1.5 ml) in provette da congelamento da 2 ml (da 2 a 4 aliquote) già etichettate.
- Per il congelamento rapido porre le provette in un contenitore contenente azoto liquido
- Conservare il campioni di plasma congelato in congelatori a -80 °C o in azoto liquido

*La doppia centrifugazione del plasma è raccomandata per rimuovere tutti i contaminanti cellulari in modo che il plasma possa essere utilizzato per l'analisi del DNA. E' estremamente importante, quindi non toccare né il buffy coat dopo la prima centrifugazione, né l'eventuale pellet dopo la seconda.

Conservazione di campioni di Siero

Il sangue deve essere raccolto in vacutainer senza anticoagulanti. I prelievi devono, quindi, essere tenuti per circa 30 minuti a temperatura ambiente, finché sarà possibile distinguere 2 fasi, una fase solida (contenente cellule e fibrina) ed una liquida (contenente siero). I campioni dovranno quindi essere processati come segue:

- Centrifugare il sangue a 1500xg per 10 minuti a temperatura ambiente
- Aliquotare il siero (1 – 1.5 ml) in provette da congelamento da 2 ml già etichettate (2 - 4 aliquote per paziente)
- Per il congelamento rapido porre le provette in un contenitore (*dewar*) contenente azoto liquido
- Conservare il campioni di plasma congelato in congelatori a -80 °C o in azoto liquido

Conservazione di campioni di sangue intero

- Utilizzare vacutainer contenenti EDTA per il prelievo di sangue.

- Dopo il prelievo invertire la provetta 10 volte per miscelare il sangue con l'anticoagulante.
- Aliquotare in cryovials da 1- 1.5 ml (da 2 a 4 aliquote per paziente)
- Congelare a -80°C o in azoto liquido

ALLEGATO 4

Procedure Operative Standard per la Raccolta e Processazione dei Campioni di Sangue: separazione e conservazione di linfociti

Separazione e congelamento dei linfomononucleati del sangue periferico

Reagenti:

- Ficoll-Hypaque o Lymphoprep
- Soluzione Hanks
- Medium per colture cellulari RPMI
- FCS (Siero bovino fetale)
- DMSO
- Medium di congelamento (90% FCS + 10% DMSO)

Materials:

- 50 ml tubi sterili
- 15 ml tubi sterili
- pipette sterili (5-10 ml)
- provette da congelamento (1 or 2 ml)

Metodi:

Le cellule mononucleate (MNC) sono isolate da sangue fresco eparinato con gradiente su Ficoll e centrifugazione:

- stratificare 20 ml di sangue su 12 ml di Fycoll in una provetta da 50 ml
- centrifugare le provette per 20 min a 2200 rpm at 20-22°C, ponendo attenzione a non inserire il freno della centrifuga
- raccogliere le MNC all'interfacie tra plasma e Fycoll in provette da 15 ml e lavare le cellule tre volte con soluzione di Hanks
- dopo aver lavato, diluire le cellule in 4-6 ml di RPMI 1%FCS e contarle utilizzando come colorante tripan blue o altra metodica che permette di contare solo le cellule vitali. Da 40 ml di sangue ci si attende il recupero di circa 100×10^6 MNC.

- Preparare il medium di congelamento e tenerlo a 4°C.
- Pellettare le MNC (1500 rpm per 5 min), eliminare il sovrantante e risospendere le cellule a 10×10^6 cells/ml in medium di congelamento fresco.
- Mettere 1 o 2 ml di sospensione cellulare in ciascuna provetta da congelamento e collocare le provette in un contenitore isolato termicamente come una scatola di polistirolo o se disponibile per un recupero ottimale utilizzare un criocontenitore chiamato CRIOSTEP prodotto da Nalgene cat.# 5100-0001, at -70/80°C per 24 ore, quindi spostare le cellule in azoto liquido.

ALLEGATO 5

Isolamento di colangiociti (hBEC, human biliary epithelial cells) (*Joplin R, J Pathol 1990; J Clin Invest 1992*)

1. Sezionare molto finemente almeno 30gr di tessuto epatico.
2. Incubare a 37°C per 60/90min il tessuto sminuzzato in una soluzione di Collagenasi 1A 1mg/ml in PBS (+ Ca²⁺ 0.90mM e Mg²⁺ 0.49mM).
3. Filtrare il tessuto e semipurificare il filtrato su gradiente di Percoll.
4. Centrifugare le cellule così ottenute per eliminare il Percoll e salvare il pellet.
5. Incubare 30min con l'anticorpo anti-HEA-125.
6. Centrifugare e incubare per 30min con Dyna Beads paramagnetiche.
7. Porre nel magnete e seminare le cellule purificate in *Plating Medium* (44.5% DMEM, 44.5% HAM's F12, 10% FBS, 1% Penicillina/Streptomicina, 0.2% tossina colerica, 0.25% Insulina, 0.01% EGF, 0.08% idrocortisone).
8. Dopo 2-3 gg, verificata l'adesione delle cellule alla fiasca di coltura, sostituire il *Plating Medium* con il *Growth Medium* (uguale composizione, tranne 5% FBS e l'aggiunta di 0.01% HGF).
9. Preparare il medium di congelamento (50%FBS + 40% DMEM freddo + 10% DMSO)
10. Preraffreddare l'etanolo assoluto con ghiaccio secco
11. Risospendere i colangiociti in medium di congelamento, agitando di tanto in tanto, e successiva dispensare il contenuto in cryovials (1,5ml per vial, da una fiasca si ottengono generalmente 2 vials)
12. A medium congelato, passare le cryovials in azoto liquido.

Isolamento di Epatociti, cellule endoteliali e cellule mesenchimali.

1. Perfundere il tessuto epatico con HBSS senza calcio e magnesio a 37°C per eliminare il sangue presente nel campione.
2. Perfundere il tessuto con una soluzione enzimatica, portata a 37°C, composta da William's E medium con calcio e magnesio, 0.4 mg/ml di liberasi e 0.12 mg/ml di DNAsi in modo da ottenere una parziale digestione della matrice cellulare.
3. Incubare il tessuto parzialmente digerito e sminuzzato nella soluzione enzimatica a 37°C per 20-30 minuti.
4. Recuperare la soluzione enzimatica contenente le cellule dissociate dal tessuto.

5. Terminare in maniera meccanica la dissociazione del tessuto non digerito (ad esempio mediante lo stantuffo di una siringa) e risospendere le cellule ottenute in William's E medium.
6. Riunire questa sospensione cellulare con la soluzione enzimatica precedentemente recuperata.
7. Filtrare la sospensione cellulare per eliminare i frammenti di tessuto non digeriti.
8. Centrifugare per 5 minuti a 650 rpm la sospensione cellulare filtrata, tenere il surnatante e risospendere il pellet cellulare.
9. Centrifugare nuovamente la sospensione cellulare a 650 rpm per 5 minuti, tenere il surnatante e risospendere il pellet cellulare composto da epatociti (piastrare gli epatociti in flask coattate con collagene I e coltivarli con apposito medium, es. HMM della Lonza)
10. Riunire i 2 surnatanti ottenuti dalle centrifugate a 650 rpm e centrifugarli per 10 minuti a 1500 rpm. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet cellulare.
11. Stratificare su gradiente ficoll la sospensione cellulare e centrifugare per 30 minuti a 2000 rpm.
12. Recuperare l'anello, risospenderlo e centrifugare per eliminare il gradiente.
13. Risospendere il pellet cellulare e piastrarlo in flask coattate con collagene e medium per la selezione delle cellule endoteliali (es. EGM della Lonza) e/o in flask non coattate con medium per la selezione delle cellule Mesenchimali (es. MSCGM della Lonza).
14. Preparare una soluzione con William's E medium + albumina umana al 4% (ma va bene anche FBS o NCS) + DMSO al 20% e tenerla in ghiaccio dopo aver mescolato adeguatamente le varie parti (medium di congelamento 2X).
15. Risospendere le cellule da congelare in un volume e ad una concentrazione desiderata (il doppio di quella finale) nel medium di coltura e metterle in ghiaccio.
16. Aggiungere lentamente la soluzione di congelamento alle cellule in pari volume agitando di tanto in tanto le cellule per tenerle in sospensione.
17. Aliquotare le cellule nelle vials da 1,8 ml e trasferirle nel contenitore con isopropanolo liquido per il congelamento.
18. Mettere il contenitore con isopropanolo nel -80°C fino al completo congelamento delle cellule (preferibilmente O/N).
19. Trasferire le cellule in azoto liquido.