

# Indice generale

Prefazione

XV

## Parte A

# Metodologie biochimiche

### CAPITOLO 1

## Introduzione alle metodologie biochimiche e biomolecolari

3

*di Annalaura Sabatucci e Mauro Maccarrone*

<b>1.1</b>	<b>L'indagine biochimica e biomolecolare</b>	3
<b>1.2</b>	<b>Il metodo scientifico</b>	3
1.2.1	Il quaderno di laboratorio	5
<b>1.3</b>	<b>Le misure e la notazione scientifica</b>	5
1.3.1	Le unità di misura	5
1.3.2	La capacità	6
<b>1.4</b>	<b>L'errore</b>	6
1.4.1	La sensibilità e l'incertezza intrinseca	7
1.4.2	La precisione e l'accuratezza	7
<b>1.5</b>	<b>L'analisi statistica</b>	8
1.5.1	La media e la deviazione standard	8
1.5.2	L'analisi inferenziale	8
1.5.3	I test di adattamento	10

### CAPITOLO 2

## Sicurezza in laboratorio

11

*di Annalaura Sabatucci e Mauro Maccarrone*

<b>2.1</b>	<b>Il rischio</b>	11
<b>2.2</b>	<b>Le sostanze chimiche pericolose</b>	11
2.2.1	Classificazione ed etichettatura	11
2.2.2	Le etichette	12
2.2.3	La scheda di sicurezza	14
2.2.4	Lo smaltimento	14
<b>2.3</b>	<b>I dispositivi di protezione individuale</b>	15
<b>2.4</b>	<b>La buona pratica di laboratorio</b>	15
<b>2.5</b>	<b>La radioprotezione</b>	16

## CAPITOLO 3

<b>Allestimento del laboratorio</b>	19
<i>di Filomena Fezza e Mauro Maccarrone</i>	
<b>3.1 Introduzione</b>	19
<b>3.2 Vetreria e plasticheria</b>	19
<b>3.3 Strumentazione di base</b>	19
3.3.1 pHmetro	19
3.3.2 Bilance	20
3.3.3 Sistemi di refrigerazione	20
3.3.4 Cappe chimiche	20
3.3.5 Armadi di sicurezza	20
3.3.6 Centrifughe	21
3.3.7 Agitatori e piastre riscaldanti	21
3.3.8 Stufe	21
3.3.9 Micropipette di precisione	21
3.3.10 Spettrofotometro	22
<b>3.4 Laboratorio per le colture cellulari</b>	22
3.4.1 Cappe a flusso laminare	22
3.4.2 Incubatori	23
3.4.3 Autoclave	23
3.4.4 Microscopi	23
3.4.5 Bagnetto termostato	24
<b>3.5 Principi di biosicurezza</b>	24

## CAPITOLO 4

<b>Volumetria e pesate</b>	26
<i>di Clotilde Beatrice Angelucci e Roberto Giacomini Stuffer</i>	
<b>4.1 Introduzione</b>	26
<b>4.2 Preparazione delle soluzioni</b>	26
<b>4.3 Modi per indicare la concentrazione di una soluzione</b>	27
<b>4.4 Linee guida per l'utilizzo della strumentazione di laboratorio</b>	29
4.4.1 Classificazione della vetreria	29
4.4.2 Modi per misurare il volume e la massa	30
<b>4.5 Lavaggio della vetreria</b>	34

## CAPITOLO 5

<b>Tecniche centrifugative</b>	35
<i>di Cinzia Rapino e Mauro Maccarrone</i>	
<b>5.1 Scopo delle tecniche centrifugative</b>	35
<b>5.2 Principi generali della sedimentazione</b>	36
5.2.1 Principali metodi di separazione per centrifugazione	38
5.2.2 Centrifugazione differenziale	38
5.2.3 Centrifugazione in gradiente di densità: centrifugazione zonale e isopicnica	39

<b>5.3</b>	<b>Strumentazione utilizzata nelle tecniche centrifugative</b>	40
5.3.1	Piccole centrifughe da banco	41
5.3.2	Centrifughe refrigerate a grande capacità	42
5.3.3	Centrifughe refrigerate ad alta velocità	42
5.3.4	Ultracentrifughe preparative	42
5.3.5	Ultracentrifughe analitiche	42
<b>5.4</b>	<b>Tipi di rotori e manutenzione</b>	42
5.4.1	Rotori ad angolo fisso	42
5.4.2	Rotori a bracci oscillanti	43
5.4.3	Rotori per tubi ad alloggiamento verticale	43
5.4.4	Contenitori del campione	43
5.4.5	Cura dell'attrezzatura per la centrifugazione	43
<b>5.5</b>	<b>Applicazioni della centrifugazione nelle industrie farmaceutiche</b>	44
5.5.1	Produzione di farmaci sfusi ( <i>bulk drugs</i> )	44
5.5.2	Produzione di materiale biologico	44
5.5.3	Valutazione di sospensioni ed emulsioni	44
5.5.4	Determinazione del peso molecolare dei polimeri	44

## CAPITOLO 6

	<b>Tecniche spettroscopiche</b>	45
	<i>di Gianfranco Gilardi</i>	
<b>6.1</b>	<b>Spettroscopia</b>	45
6.1.1	Radiazione elettromagnetica	45
6.1.2	Interazione della radiazione elettromagnetica con la materia	46
<b>6.2</b>	<b>Spettroscopia di assorbimento della radiazione nell'ultravioletto e nel visibile</b>	48
6.2.1	Livelli energetici e transizioni elettroniche	49
6.2.2	Cromofori e metalli di transizione nelle biomolecole	50
6.2.3	Applicazioni alle proteine	51
<b>6.3</b>	<b>Fluorescenza</b>	53
6.3.1	Spettri di eccitazione ed emissione	53
6.3.2	Tempi di vita e resa quantica	54
6.3.3	Polarizzazione	55
6.3.4	Effetto dell'intorno molecolare sulla fluorescenza e "quenching"	55
6.3.5	Fluorescenza risolta nel tempo	57
6.3.6	Misure di dinamica molecolare	57
6.3.7	Depolarizzazione della fluorescenza	58
6.3.8	Determinazione della distanza tra fluorofori nelle biomolecole	60
<b>6.4</b>	<b>Spettroscopia di assorbimento della radiazione nell'infrarosso (IR)</b>	62
6.4.1	Misura dello spettro IR	64
6.4.2	Assorbimento IR delle proteine e determinazione della struttura secondaria	65

## CAPITOLO 7

<b>Tecniche cromatografiche</b>	68
<i>di Gennaro Agrimi e Luigi Palmieri</i>	
<b>7.1 Introduzione e principi generali</b>	68
<b>7.2 Tempo di ritenzione e risoluzione cromatografica</b>	69
7.2.1 Selettività	70
7.2.2 Fattore di capacità	70
7.2.3 Efficienza della colonna cromatografica	70
<b>7.3 Tipologie di cromatografia su colonna</b>	72
7.3.1 Cromatografia a scambio ionico (IEC)	72
7.3.2 Cromatografia a esclusione molecolare o gel-filtrazione (SEC)	74
7.3.3 Cromatografia di affinità (AC)	76
7.3.4 Cromatografia di partizione (PC)	78
7.3.5 Cromatografia di adsorbimento (AdC)	79
<b>7.4 HPLC</b>	80

## CAPITOLO 8

<b>Tecniche elettroforetiche</b>	84
<i>di M. Eugenia Schininà e Alessandra Giorgi</i>	
<b>8.1 Scopo della metodica</b>	84
<b>8.2 Principi generali</b>	84
8.2.1 Grandezze e relazioni matematiche	85
8.2.2 Fattori che influenzano la migrazione elettroforetica	86
8.2.3 Principali tecniche elettroforetiche	87
<b>8.3 Strumentazione</b>	90
8.3.1 Apparati per elettroforesi zonale	90
8.3.2 Strumentazioni per l'elettroforesi capillare	92
<b>8.4 Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	93
8.4.1 Il protidogramma	93
8.4.2 Diagnosi molecolare di emoglobinopatie	93
8.4.3 Determinazione del peso molecolare delle macromolecole	94
8.4.4 Elettrotrasferimento	95
8.4.5 Analisi di polimorfismi genetici	96
8.4.6 Studio di interazioni tra acidi nucleici e proteine	97
8.4.7 Mappe proteomiche	97
<i>In laboratorio 8.1 Elettroforesi in fase liquida (o a fronte mobile)</i>	98
<i>In laboratorio 8.2 Elettroforesi zonale</i>	99
<i>In laboratorio 8.3 Focalizzazione isoelettrica (IEF)</i>	100
<i>In laboratorio 8.4 SDS-PAGE e analisi delle proteine</i>	101
<i>In laboratorio 8.5 Elettroforesi capillare</i>	102
<i>In laboratorio 8.6 Elettroforesi e analisi degli acidi nucleici</i>	103

## CAPITOLO 9

<b>Tecniche radiochimiche</b>	104
<i>di Anna Maria Sardanelli e Antonio Gnoni</i>	
<b>9.1 La radiochimica</b>	104

<b>9.2</b>	<b>Gli isotopi</b>	104
9.2.1	Decadimento radioattivo ed energia delle radiazioni	105
9.2.2	Unità di misura	109
<b>9.3</b>	<b>Strumentazione</b>	110
9.3.1	Rivelatori a gas	110
9.3.2	Contatori a scintillazione	110
<b>9.4</b>	<b>Applicazioni dei radioisotopi</b>	111
9.4.1	La diluizione isotopica	111
9.4.2	Radioimmunologia (RIA e IRMA)	112
9.4.3	Autoradiografia	114
9.4.4	Diagnostica <i>in vivo</i>	114
<b>9.5</b>	<b>Norme per l'uso di radioisotopi</b>	115

## CAPITOLO 10

	<b>Tecniche immunochemiche</b>	117
	<i>di Paola Bruni e Francesca Cencetti</i>	
<b>10.1</b>	<b>Scopo della metodica</b>	117
<b>10.2</b>	<b>Principi generali</b>	118
10.2.1	Test di precipitazione	120
10.2.2	Test di agglutinazione	122
10.2.3	I dosaggi immunologici	122
10.2.4	Dosaggi immunometrici e immunodosaggi competitivi	123
10.2.5	Immunoblotting	124
10.2.6	Immunoistochimica e immunofluorescenza	125
10.2.7	Citofluorimetria a flusso	126
<b>10.3</b>	<b>Strumentazione</b>	126
<b>10.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	128

## Parte B

# Metodologie biomolecolari

## CAPITOLO 11

	<b>Isolamento del DNA e Southern blot</b>	133
	<i>di Alessandro Terrinoni</i>	
<b>11.1</b>	<b>La tecnica del Southern blot</b>	133
<b>11.2</b>	<b>Estrazione del DNA</b>	133
<b>11.3</b>	<b>Utilizzo della tecnica del Southern blot in biologia molecolare</b>	135
11.3.1	Prima fase: digestione e corsa elettroforetica	135
11.3.2	Seconda fase: trasferimento del DNA	137
11.3.3	Problematiche del trasferimento	138
<b>11.4</b>	<b>Terza fase: ibridazione del DNA</b>	138
11.4.1	Marcatura della sonda	138
11.4.2	Ibridazione	139
<b>11.5</b>	<b>Stringenza</b>	139
<b>11.6</b>	<b>Rilevazione del segnale</b>	139

## CAPITOLO 12

<b>Isolamento dell'RNA e Northern blot</b>	141
<i>di Alessandro Terrinoni</i>	
<b>12.1 La tecnica del Northern blot</b>	141
<b>12.2 Estrazione dell'RNA</b>	141
<b>12.3 Utilizzo della tecnica del Northern blot in biologia molecolare</b>	142
<b>12.4 Precauzioni nel trattamento dell'RNA</b>	142
<b>12.5 Fasi del Northern blot</b>	143
12.5.1 Corsa dell'RNA in condizioni denaturanti	144
12.5.2 Trasferimento dell'RNA	145
12.5.3 Marcatura della sonda	145
12.5.4 Ibridazione	145
12.5.5 Rilevazione del segnale	146

## CAPITOLO 13

<b>Amplificazione mediante PCR</b>	147
<i>di Mauro Magnani e Michele Menotta</i>	
<b>13.1 Scopo della metodica</b>	147
<b>13.2 Principi generali</b>	147
13.2.1 Miscela di reazione	149
13.2.2 Procedimento	149
13.2.3 Fattori limitanti	150
13.2.4 Protocolli a due temperature	150
13.2.5 Ottimizzazione del processo	150
13.2.6 Varianti della PCR	152
13.2.7 Analisi dei prodotti di PCR	152
<b>13.3 Strumentazione</b>	152
13.3.1 Termociclatore	153
<b>13.4 Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	153

## CAPITOLO 14

<b>Clonaggio molecolare</b>	156
<i>di Serena Rinaldo, Giorgio Giardina e Francesca Cutruzzolà</i>	
<b>14.1 Scopo del clonaggio molecolare</b>	156
<b>14.2 Principi generali</b>	157
14.2.1 Isolamento del gene	157
14.2.2 Scelta e preparazione del vettore	158
14.2.3 Metodi di clonaggio	158
<b>14.3 Strumentazione</b>	164
<b>14.4 Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	165

## CAPITOLO 15

<b>Vettori di espressione</b>	167
<i>di Giovanni Antonini e Manuela Cervelli</i>	
<b>15.1 Scopo della metodica</b>	167

<b>15.2</b>	<b>Principi generali</b>	168
15.2.1	Vettori di espressione in <i>Escherichia coli</i>	168
15.2.2	Vettori di espressione in lievito	170
15.2.3	Vettori di espressione in cellule di insetto	171
15.2.4	Vettori di espressione in cellule animali	174
15.2.5	Vettori di espressione in cellule vegetali	175
<b>15.3</b>	<b>Strumentazione</b>	180
<b>15.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	180

## CAPITOLO 16

<b>Trasfezione cellulare</b>	181	
<i>di Monica Bari e Mauro Maccarrone</i>	181	
<b>16.1</b>	<b>Trasfezione</b>	181
16.1.1	Modello cellulare	181
16.1.2	Cellule adese e in sospensione	182
16.1.3	Colture cellulari primarie e immortalizzate	182
<b>16.2</b>	<b>Tecnica</b>	183
16.2.1	Metodi chimici	184
16.2.2	Metodi biologici	184
16.2.3	Metodi fisici	184
16.2.4	Trasfezione transiente e stabile	185
<b>16.3</b>	<b>Strumentazione</b>	186
<b>16.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	187

## CAPITOLO 17

<b>Basi di epigenetica: focus sullo studio della metilazione del DNA gene-specifica</b>	188	
<i>di Claudio D'Addario e Mariangela Pucci</i>		
<b>17.1</b>	<b>Epigenetica</b>	188
<b>17.2</b>	<b>Metilazione del DNA</b>	189
<b>17.3</b>	<b>Valutazione dello stato di metilazione</b>	190
17.3.1	Digestione con endonucleasi sensibili a metilazione	190
17.3.2	Trattamento con bisolfito di sodio	191
<b>17.4</b>	<b>Pirosequenziamento</b>	192
17.4.1	Analisi dei risultati	195
<b>17.5</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	195

## CAPITOLO 18

<b>Silenziamento e overespressione genica</b>	197	
<i>di Michele Sallese e Vincenzo De Laurenzi</i>		
<b>18.1</b>	<b>Perché modificare i livelli di espressione di un gene?</b>	197
<b>18.2</b>	<b>Silenziamento genico</b>	197
18.2.1	Silenziamento genico con oligonucleotidi antisense	197
18.2.2	Silenziamento genico tramite RNAi	199
18.2.3	Overespressione genica	201
<b>18.3</b>	<b>Applicazioni terapeutiche del silenziamento e dell'overespressione genica</b>	202

## CAPITOLO 19

<b>Tecnologia CRISPR</b>	206
<i>di Michele Sallese e Vincenzo De Laurenzi</i>	
<b>19.1 Scopo della tecnologia CRISPR/Cas9</b>	206
<b>19.2 Editing genomico</b>	206
19.2.1 Dagli enzimi di restrizione all'editing genomico	206
19.2.2 La scoperta del sistema CRISPR/Cas9	207
19.2.3 CRISPR/Cas9 per modificare il genoma umano	208
19.2.4 Isolamento di cellule con DNA modificato	209
19.2.5 Principali problematiche associate all'uso del sistema CRISPR/Cas9	210
<b>19.3 Ulteriori utilizzi di CRISPR/Cas9</b>	210
<b>19.4 Applicazioni biotecnologiche e clinico-terapeutiche di CRISPR/Cas9</b>	211

## CAPITOLO 20

<b>Bioinformatica</b>	214
<i>di Rita Casadio e Pier Luigi Martelli</i>	
<b>20.1 Premessa</b>	214
<b>20.2 L'annotazione funzionale</b>	214
20.2.1 La funzione proteica in bioinformatica	215
20.2.2 La banca dati di termini Gene Ontology (GO)	215
<b>20.3 La superfamiglia delle amminotrasferasi</b>	218
<b>20.4 Le famiglie proteiche</b>	219
<b>20.5 Le basi teoriche del processo di annotazione</b>	220
20.5.1 Come risolvere il problema dell'annotazione funzionale	220
20.5.2 I casi difficili	222
<b>20.6 Conclusioni</b>	223

## Parte C

## Parte speciale

## CAPITOLO 21

<b>Produzione di anticorpi policlonali e monoclonali</b>	227
<i>di Sergio Oddi, Lucia Scipioni e Mauro Maccarrone</i>	
<b>21.1 Scopo della metodica</b>	227
<b>21.2 Principi generali e strumentazione</b>	228
21.2.1 Produzione di anticorpi policlonali	228
21.2.2 Produzione di anticorpi monoclonali	230
21.2.3 Produzione di anticorpi ingegnerizzati	231
<b>21.3 Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	231
21.3.1 Tecniche preparative	232
21.3.2 Tecniche analitiche	232
21.3.3 Applicazioni diagnostiche e terapeutiche	232

## CAPITOLO 22

## Cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa

di *Fabiana Piscitelli e Tiziana Bisogno*

<b>22.1</b>	<b>Introduzione</b>	233
<b>22.2</b>	<b>La tecnica LC-MS</b>	233
<b>22.3</b>	<b>Lo spettrometro di massa</b>	234
	22.3.1 Sorgenti ioniche	234
	22.3.2 Analizzatori	236
<b>22.4</b>	<b>Modalità di acquisizione</b>	237
	22.4.1 Full scan MS	238
	22.4.2 Selected Ion Monitoring	238
	22.4.3 Product ion scan	238
	22.4.4 Selected Reaction Monitoring e Multiple Reaction Monitoring	238
	22.4.5 Neutral Loss Scan	238
	22.4.6 Precursor Ion Scan	239
<b>22.5</b>	<b>Applicazioni</b>	239
	22.5.1 Screening biochimico per i disordini genetici	239
	22.5.2 Tossicologia forense	239

## CAPITOLO 23

## Biologia strutturale

di *Martino Bolognesi, Giovanna Musco e Paolo Swuec*

<b>23.1</b>	<b>Scopo della metodica</b>	241
<b>23.2</b>	<b>Principi generali</b>	242
	23.2.1 Cristallografia a raggi X	242
	23.2.2 Risonanza magnetica nucleare in soluzione	244
	23.2.3 Crio-microscopia elettronica	248
<b>23.3</b>	<b>Strumentazione</b>	252
	23.3.1 Cristallografia a raggi X	252
	23.3.2 Risonanza magnetica nucleare	255
	23.3.3 Crio-microscopia elettronica	256
	23.3.4 Analisi tramite TEM	257
<b>23.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	258

## CAPITOLO 24

## Metodica SAXS

di *Enrico Dainese*

<b>24.1</b>	<b>Scopo della metodica</b>	261
<b>24.2</b>	<b>Principi generali</b>	262
<b>24.3</b>	<b>Strumentazione</b>	266
<b>24.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	268

## CAPITOLO 25

## Citofluorimetria

di *Valerio Chiurchiù e Mauro Maccarrone*

<b>25.1</b>	<b>Introduzione alla citofluorimetria</b>	270
<b>25.2</b>	<b>Principi di base della citofluorimetria</b>	270

<b>25.3</b>	<b>Strumentazione: il citofluorimetro e le sue componenti</b>	271
25.3.1	Sistema fluidico	272
25.3.2	Sistema ottico	272
25.3.3	Sistema elettronico	273
<b>25.4</b>	<b>Marcatori fluorescenti</b>	274
<b>25.5</b>	<b>Vantaggi e limiti della citofluorimetria</b>	275
<b>25.6</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica della citofluorimetria</b>	276

## CAPITOLO 26

<b>Analisi al citofluorimetro</b>	279	
<i>di Valerio Chiurchiù</i>		
<b>26.1</b>	<b>Preparazione dei campioni</b>	279
<b>26.2</b>	<b>Marcatura delle cellule</b>	279
26.2.1	Marcatura di superficie e intracellulare	280
26.2.2	Scelta dei fluorocromi	280
26.2.3	Compensazione	281
<b>26.3</b>	<b>Rappresentazione dei dati citofluorimetrici</b>	281
26.3.1	Software di analisi	282
26.3.2	Strategia di <i>gating</i> e analisi dei dati	282
<b>26.4</b>	<b>Esempi di analisi citofluorimetrica</b>	284
26.4.1	Immunofenotipizzazione	284
26.4.2	Ciclo cellulare	285
26.4.3	Apoptosi e necrosi	286
26.4.4	Produzione di citochine	287

## CAPITOLO 27

<b>Analisi in <i>live imaging</i></b>	289	
<i>di Lucia Scipioni e Sergio Oddi</i>	289	
<b>27.1</b>	<b>Scopo della metodica</b>	289
<b>27.2</b>	<b>Principi generali</b>	289
<b>27.3</b>	<b>Strumentazione</b>	292
27.3.1	Scelta del microscopio	292
27.3.2	Scelta del fluoroforo	293
27.3.3	Camere di <i>imaging</i>	293
<b>27.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	294

## CAPITOLO 28

<b>Risonanza plasmonica di superficie e tecniche <i>label-free</i></b>	295	
<i>di Enrico Dainese</i>		
<b>28.1</b>	<b>Scopo della metodica</b>	295
<b>28.2</b>	<b>Principi generali</b>	296
<b>28.3</b>	<b>Strumentazione</b>	299
<b>28.4</b>	<b>Applicazioni e rilevanza biomedica</b>	301

## CAPITOLO 29

<b>Metodiche per l'analisi trascrittomic</b>	302
<i>di Daniele F. Condorelli, Vincenza Barresi e Giacomo Cinnirella</i>	
<b>29.1 Trascrittomic</b>	302
<b>29.2 Microarray per lo studio dell'espressione genica</b>	302
29.2.1 Microarray fotolitografici	302
29.2.2 3' Expression array	303
29.2.3 Whole transcript expression array	304
<b>29.3 RNA-Seq</b>	306
<b>29.4 Analisi dell'espressione genica differenziale</b>	307
29.4.1 Analisi dei dati da microarray di espressione	307
29.4.2 Analisi dei dati da RNA-Seq	308

## CAPITOLO 30

<b>Applicazioni delle metodologie biomolecolari in biochimica clinica</b>	310
<i>di Rosario Ammendola, Gabriella Esposito e Fabio Cattaneo</i>	
<b>30.1 PCR digitale</b>	310
30.1.1 Scopo della metodica	310
30.1.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	310
<b>30.2 Citofluorimetria</b>	313
30.2.1 Scopo della metodica	313
30.2.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	314
30.2.3 Limiti della metodica	316
<b>30.3 Trascrittomic</b>	316
30.3.1 Scopo della metodica	316
30.3.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	316
30.3.3 Limiti della metodica	317
<b>30.4 Metabolomica</b>	317
30.4.1 Scopo della metodica	317
30.4.2 Applicazioni e rilevanza biomedica	318
30.4.3 Limiti della metodica	320

## Parte D

## Eserciziario

Parte A – Esercizi di metodologie biochimiche	325
Parte B – Esercizi di metodologie biomolecolari	331
Parte C – Esercizi sulla parte speciale	337
Risposte agli esercizi	343
Glossario	357
Indice analitico	379