

# Malattie genetiche: dalla diagnosi alla terapia

## LA FIBROSI CISTICA

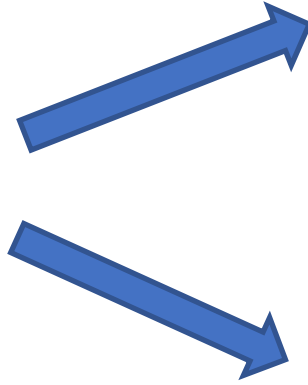
### *Modelli epiteliali umani per lo studio della fibrosi cistica*

COS'E' E A COSA  
SERVE UN  
MODELLO IN  
VITRO DI EPITELIO  
RESPIRATORIO?

COME SI ALLESTISCE UN  
MODELLO 2D  
DI EPITELIO RESPIRATORIO?

QUALI APPLICAZIONI HA QUESTA  
TECNOLOGIA APPLICAZIONI PER LO  
STUDIO DELLA FIBROSI CISTICA?

A COSA SERVE  
UN MODELLO 2D  
DI EPITELIO  
RESPIRATORIO ?



Studio della fisio-patologia  
della FIBROSI CISTICA

SCREENING di composti chimici  
con potenziale attività  
farmacologica

I MODELLI DI EPITELIO 2D PERMETTONO UNA VALUTAZIONE DEI PARAMETRI FISIologici DI UN EPITELIO CHE NON POTREBBERO ESSERE STUDIATI SU CELLULE ISOLATE IN COLTURA SENZA L'UTILIZZO DI MODELLI IN VIVO

LE CELLULE UTILIZZATE PER OTTENERE QUESTO TIPO DI MODELLO SONO LE STESS E CHE POSSONO ESSERE UTILIZZATE PER OTTENERE:

**-MODELLI 2D:**

Condizione di coltura: in CONDIZIONE SOMMERSA o  
in AIR LIQUID INTERFACE

**- ORGAN ON A CHIP**

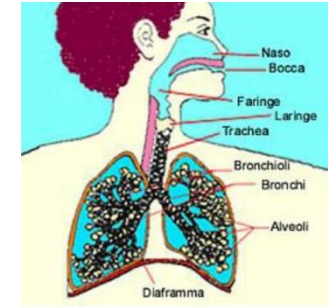
**- MODELLI 3D**

**- ORGANOIDI**

# EPITELIO RESPIRATORIO

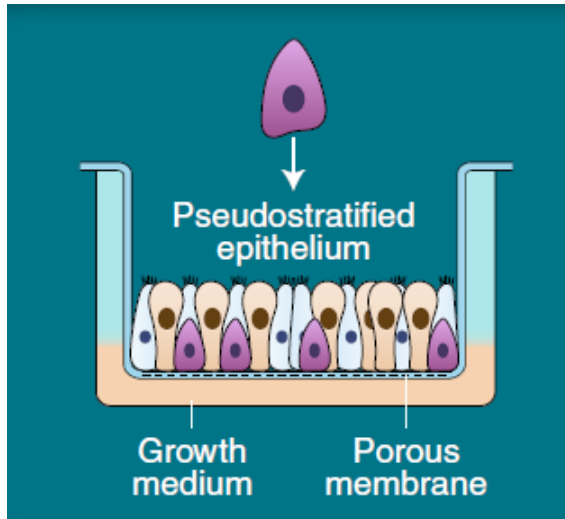
L'albero respiratorio si suddivide in 3 regioni:

- Superiore (naso, faringe, laringe)
- Inferiore (trachea bronchi, bronchioli)
- Alveolare



L'epitelio respiratorio forma una barriera protettiva tra l'aria inalata ( che può contenere microbi, agenti inquinanti ecc) e la mucosa sottostante.

## MODELLI DI EPITELIO RESPIRATORIO 2D



Sono costituiti da cellule che formano un epitelio pseudo-stratificato polarizzato composto da:

Cellule basali

Cellule ciliate

Cellule mucipare (secernono muco)

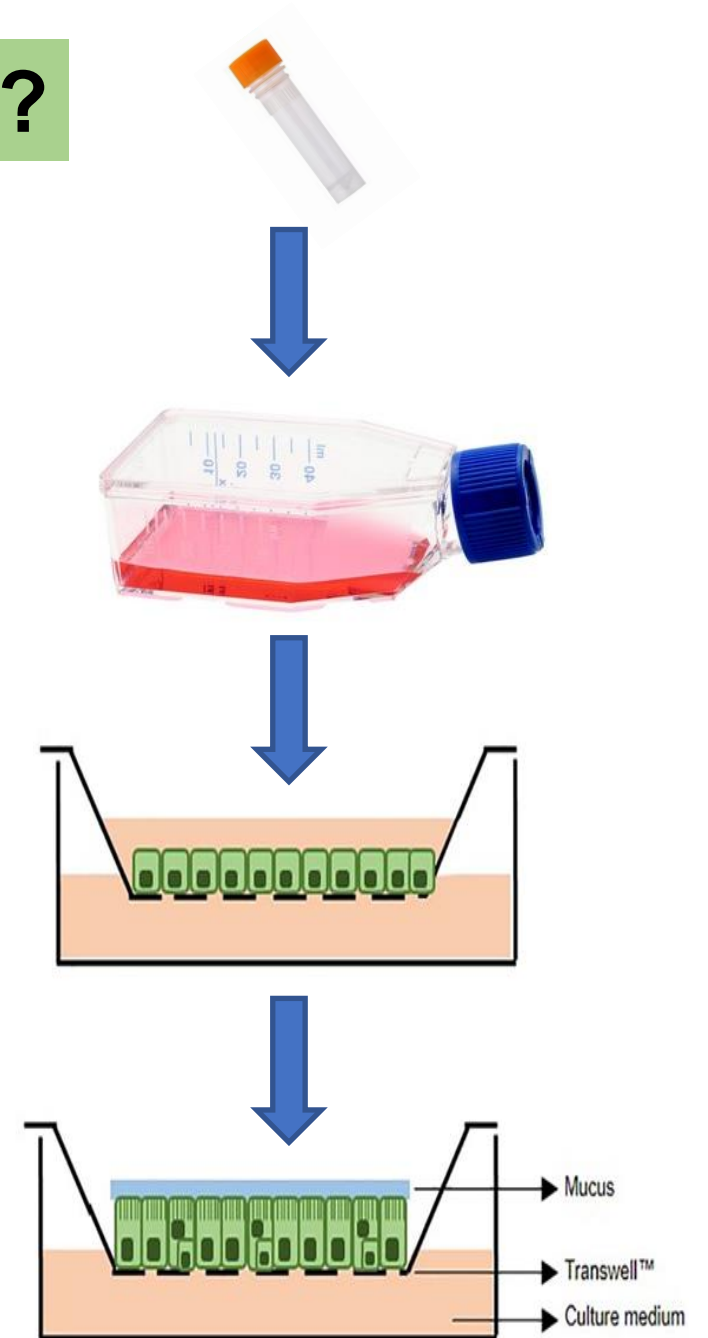
Tenute insieme strettamente da tight junctions

La differenziazione muco-ciliare dell'epitelio è indicata dalla presenza di ciglia sulla superficie apicale e dalla secrezione di muco

La coltura in condizioni coltura di interfaccia aria-liquido permette la maturazione dell'epitelio

# COME SI ALLESTISCE UN EPITELIO 2D?

- Scongellamento delle cellule
- Espansione delle cellule
- Semina delle cellule su supporto poroso
- Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI
- **FORMAZIONE DI UN EPITELIO POLARIZZATO MATURO**



# COME SI ALLESTISCE UN EPITELIO 2D?

## -> Scongelamento delle cellule

- Espansione delle cellule
- Semina delle cellule su supporto poroso
- Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI
- **FORMAZIONE DI UN EPITELIO POLARIZZATO MATURO**

Le cellule vanno:

- scongelate rapidamente a 37 °C
- centrifugate a 1000 RPM per 5 minuti
- piastrate in una fiasca T75



## Tipi di cellule che usiamo:

### Cellule primarie umane:


HBE: human bronchial epithelial cell, da donatori

### Linee cellulari secondarie:

Calu3: human lung adenocarcinoma cells

CFBE41o- :human bronchial cells che esprimono la mutazione F508del

# COME SI ALLESTISCE UN EPITELIO 2D?

- Scongelamento delle cellule
-  Espansione delle cellule
- Semina delle cellule su supporto poroso
- Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI
- **FORMAZIONE DI UN EPITELIO POLARIZZATO MATURO**

## CELLULE PRIMARIE



- Coating con collagene
- 1° taglio : non andare oltre il 70% di confluenza
- 2° taglio: aumentare la percentuale di confluenza senza arrivare al 100%

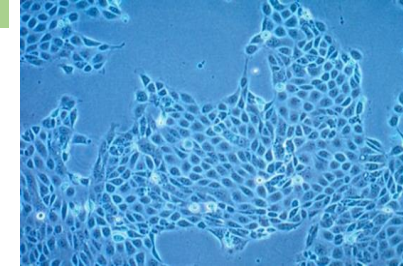
## LINEE CELLULARI SECONDARIE



- Nessun coating
- Espansione in fiasca sino a confluenza

# COME SI ALLESTISCE UN EPITELIO 2D?

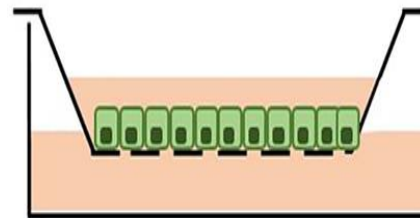
- Scongelamento delle cellule
- Espansione delle cellule
- **Semina delle cellule su supporto poroso**
- Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI
- **FORMAZIONE DI UN EPITELIO POLARIZZATO MATURO**



Transwell Corning 3397



Snapwell Corning 3081



- Poliestere, pori da 0.4  $\mu\text{m}$
- 500.000 cellule/ snapwell ( $\varnothing$  1cm)
- 200.000 cellule/ transwell
- Snapwell 0.5ml AP/ 2ml BL
- Transwell 200 $\mu\text{l}$  AP/ 800 $\mu\text{l}$  BL



# COME SI ALLESTISCE UN EPITELIO 2D?

- Scongelamento delle cellule
- Espansione delle cellule
- Semina delle cellule su supporto poroso
- Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI
- FORMAZIONE DI UN EPITELIO POLARIZZATO MATURO

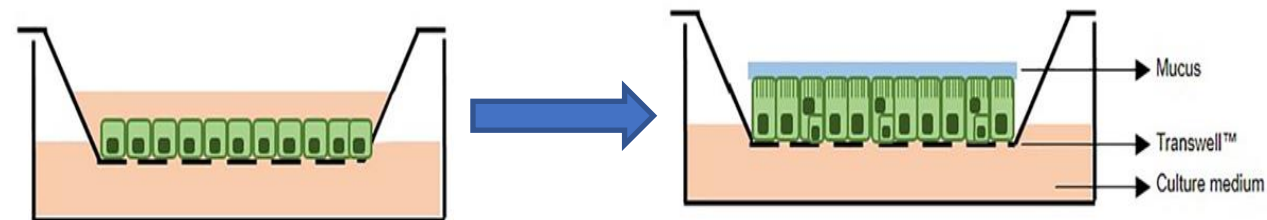
- **Cellule primarie:** cambio del mezzo AP e BL ogni 24h
- **Linee secondarie:** cambio del mezzo AP e BL ogni 48h



Prestare attenzione a non rimuovere le cellule dalla superficie apicale del supporto

Dopo 7 giorni dalla semina, il mezzo di coltura viene rimosso dalla superficie apicale si cambia solo il mezzo di coltura nel comparto baso-laterale

**SI STABILISCE LA CULTURA IN CONDIZIONE DI INTERFACCIA ARIA-LIQUIDO / ALI CULTURE**



# COME SI ALLESTISCE UN EPITELIO 2D?

- Scongellamento delle cellule
- Espansione delle cellule
- Semina delle cellule su supporto poroso
- Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI

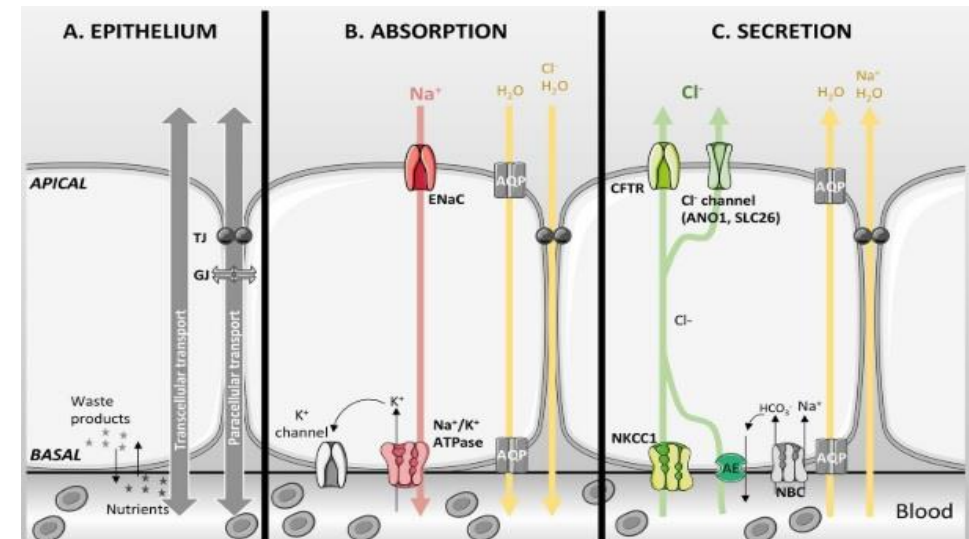
→ **FORMAZIONE DI UN EPITELIO POLARIZZATO MATURO**

La maturazione completa dell'epitelio (polarizzazione) avviene dopo 2-4 settimane dalla semina su filtro



A maturazione avvenuta si osserva una organizzazione morfofunzionale diversa delle cellule sulle due facce dell'epitelio  
Superficie apicale asciutta – nessun passaggio del mezzo di coltura dal comparto BL a quello AP

Presenza di tight junctions, ciglia, produzione di muco,



Role of CFTR in epithelial physiology- Saint-Criq, Gray, 2017.

## APPLICAZIONI

**La misura della resistenza transepiteliale (Trans epithelial electrical resistance, TEER)**

è necessaria per determinare se epitelio è sano, differenziato e funzionante

Si misura con uno strumento chiamato **voltmetro**

In letteratura si trovano i valori della resistenza che epiteli composti da cellule epiteliali di diverso tipo dovrebbero avere (ad es la resistenza di un epitelio maturo composto da cellule CALU3 dovrebbe di  $1000 \Omega\text{cm}^2$ )

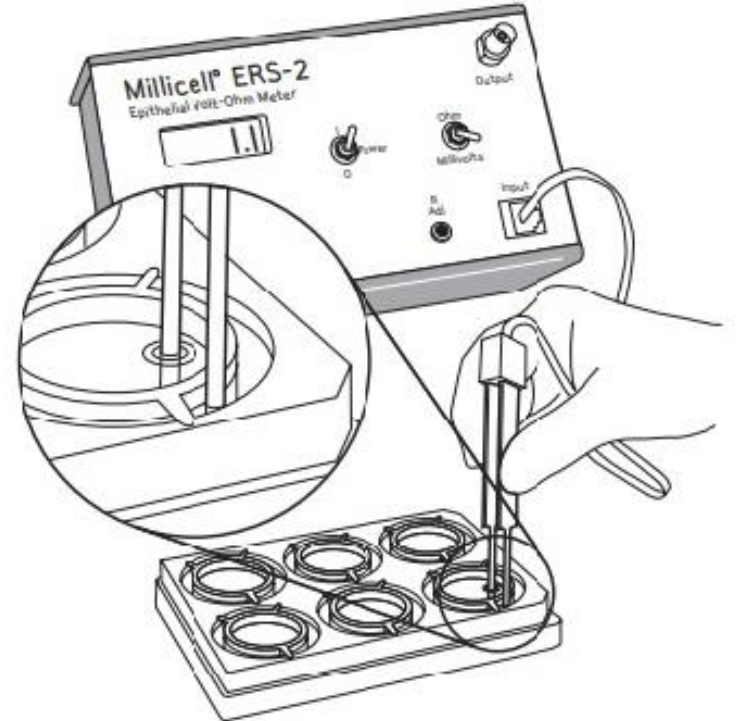
E' una misura di routine, che dovrebbe essere effettuata 1 volta/settimana

Si usa un elettrodo Ag/Cl; di piccole dimensioni per permettere di entrare a contatto con i supporti porosi

L'estremità più lunga dell'elettrodo viene posta a contatto con il liquido della camera BL

L'estremità più corta con il mezzo della camera AP

Prima di effettuare la misura, l'elettrodo viene "stabilizzato" in alcool 70% per 15-30'

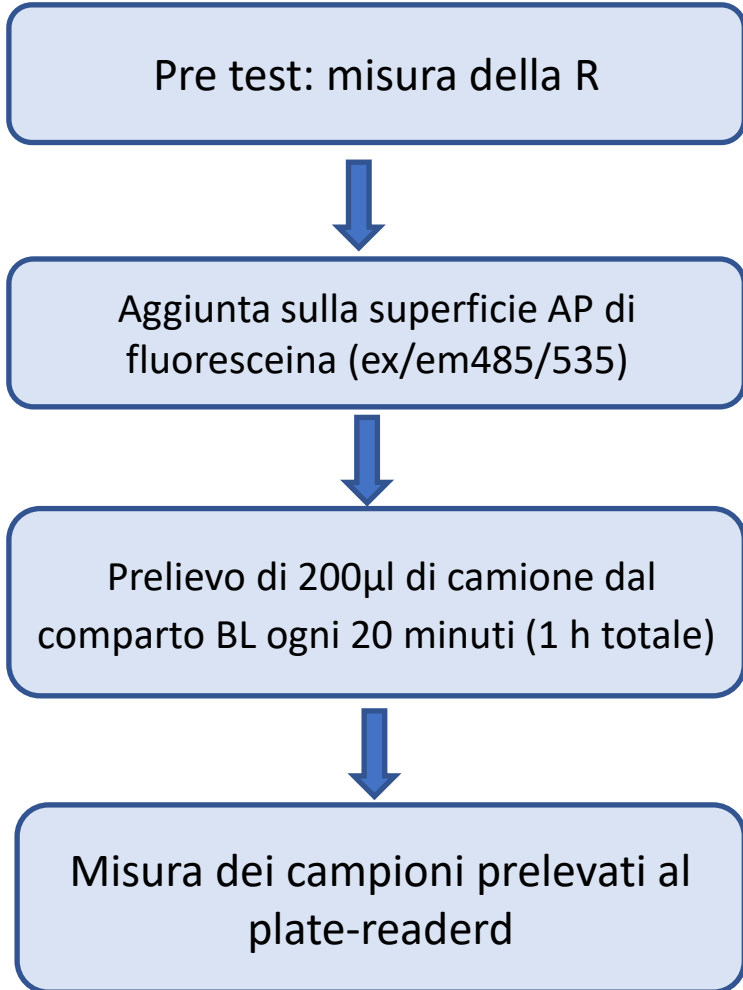


# APPLICAZIONI

In letteratura non sono presenti i valori TEER di tutti gli epiteli

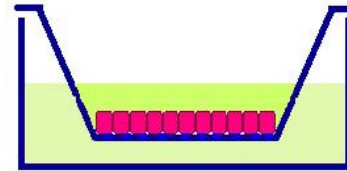


## TEST DELL'INTEGRITA' DELL'EPITELIO



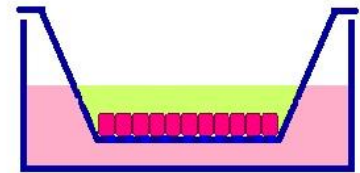
Il test viene effettuato, a partire dalla messa in ALI, ogni 3-4 giorni per un totale di 20 giorni

**SI**  
**Fluorescenza**



L'epitelio non è ancora formato/ le cellule utilizzate non sono adatte a formare epitelio

**NO**  
**fluorescenza**



L'epitelio si è formato  
Si misura la R e la si fissa come valore di riferimento di epitelio differenziato

## APPLICAZIONI

Valutazione dell'effetto di composti chimici/ farmaci sugli epitelii (respiratori)



### Nella FIBROSI CISTICA

- Valutazione del riassorbimento di fluidi ed elettroliti
- Analisi delle proprietà chimico-fisiche del muco secreto
- Valutazione della concentrazione di proteine (mucine)
- Valutazione delle proprietà visco-elastiche del muco
- Misura del trasporto transepiteliale di ioni

### ALTRE APPLICAZIONI

- Valutazione della tossicità
- Studio dell'infezione batterica

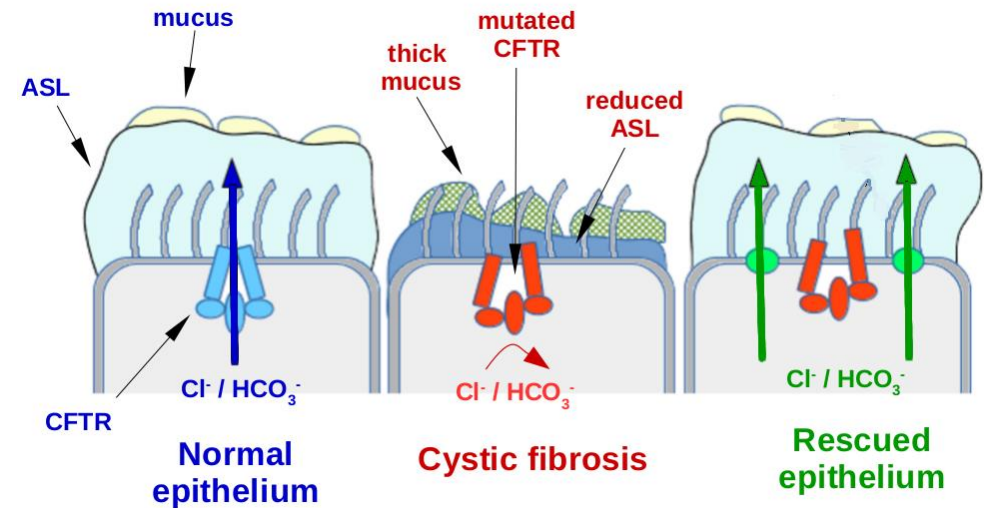
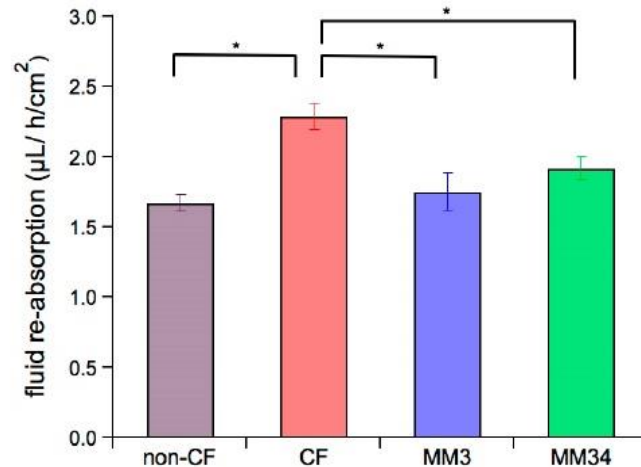
## Riassorbimento di fluido

**Scopo:** valutare differenze nelle proprietà del fluido (ASL) presente sulla superficie apicale degli epitelii

- Farmaci applicati sulla superficie apicale
- Dopo 24-48 ore (in base al tipo di composto chimico), l'ASL viene raccolto e pesato

### Cellule:

HBE (human bronchial epithelial cell)  
da pz CF con mutazione  $\Delta f508$



> Volume di campione ( $\mu\text{L}$ ) < riassorbimento ( $\mu\text{L}/\text{h}/\text{cm}^2$ )

Il trattamento con farmaci correttori del difetto di base della CFTR ha diminuito significativamente il riassorbimento di fluido

## PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DELL'ASL

### pH

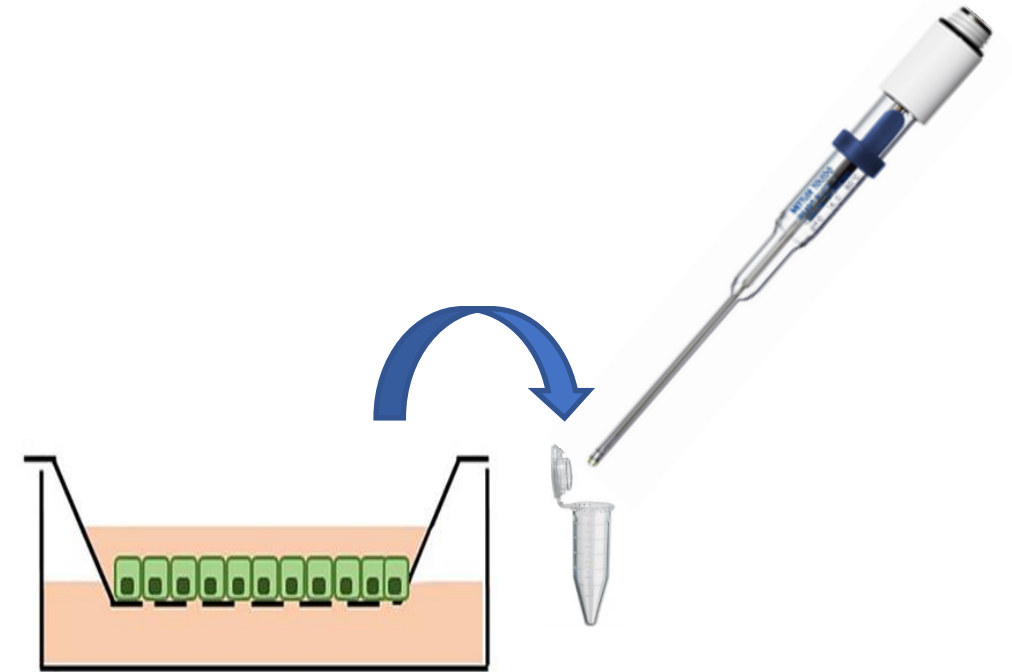
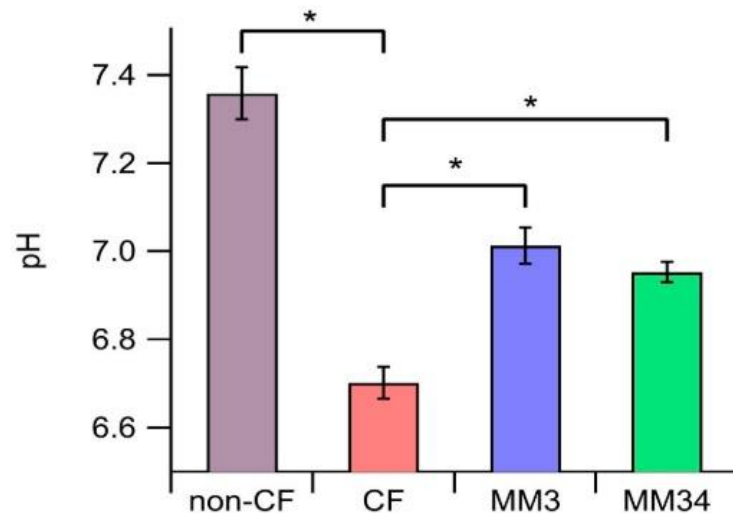
Nei pz affetti da CF, il malfunzionamento della CFTR causa una mancata secrezione di ioni cloro e bicarbonato.

Ciò determina l'acidificazione del muco.

Dopo aver recuperato l'ASL, la misura del pH è eseguita mediante micro-elettrodi per campioni di piccolo volume

### Cellule:

HBE (human bronchial epithelial cell)  
da pz CF con mutazione  $\Delta f508$



Il trattamento con farmaci correttori del difetto di base ha innalzato il pH dell'ASL.



## PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DELL'ASL

### DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI PROTEINE

Le proteine presenti nell'ASL sono principalmente mucine

La loro concentrazione è misurata con metodi colorimetrici (es saggio di Bradford) utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS



### VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE

-immunofluorescenza , microscopia confocale

- Western blot – dot blot

→ snapwell



→ transwell



La valutazione della presenza di determinate proteine serve anche per determinare il grado di differenziamento di un epitelio.  
es. ZO-1 (zonula occludens), MUC5AC, MUC5B ecc (muco), cilia ecc.



## PROPRIETA' VISCO-ELASTICHE DELL'ASL

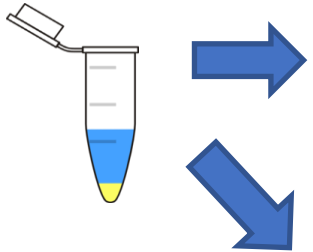
### Tecnica di video-microscopia

#### MPT – MULTIPLE PARTICLE TRACKING

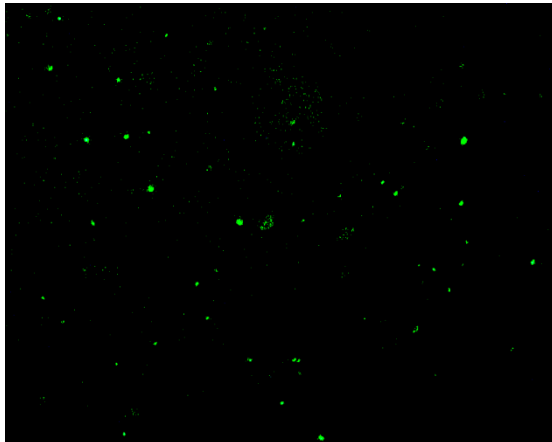
Permette di valutare la microviscosità di qualsiasi tipo di fluido (dall'acqua al glicerolo);  
Utilizza piccoli volumi di campione

#### Preparazione del campione:

Nano-biglie fluorescenti (200nm  $\emptyset$ ) + campione di ASL



Video recording con una videocamera CCD montata su un microscopio a fluorescenza  
Le biglie all'interno del fluido si muovono con moto casuale (Browniano)

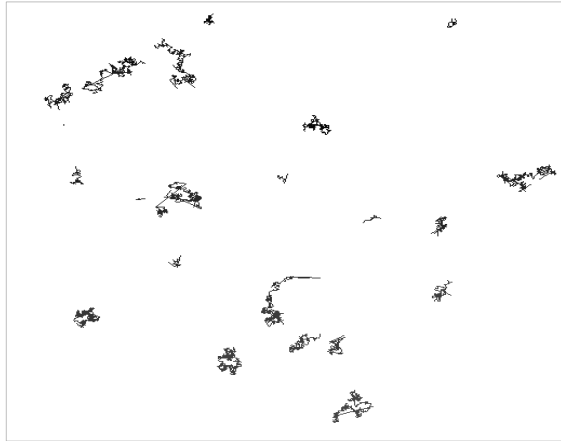
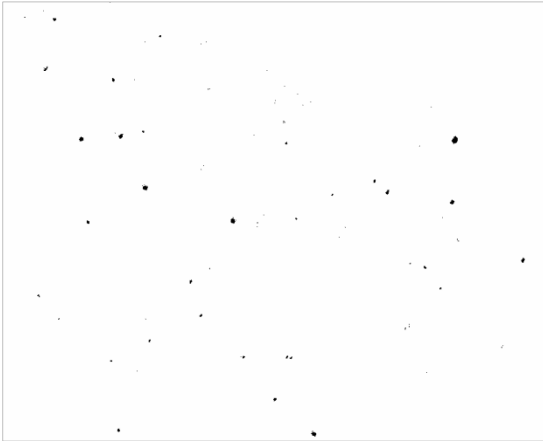


Traiettoria di una nano-biglia

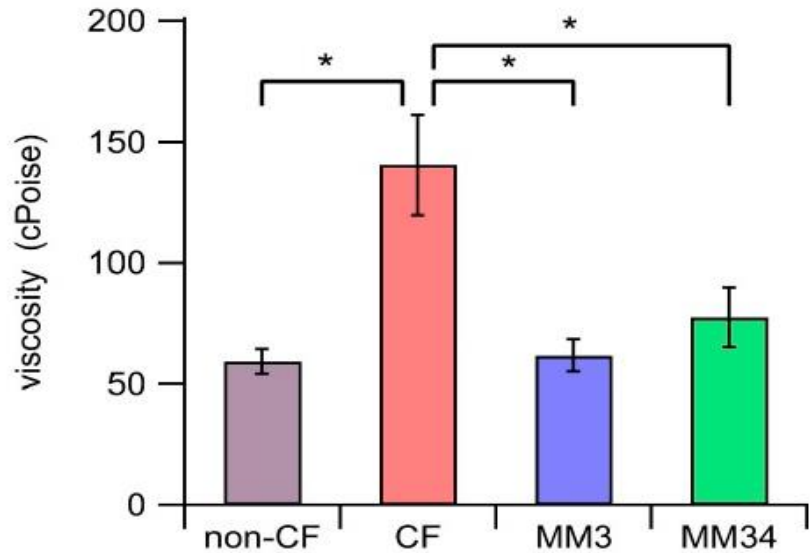
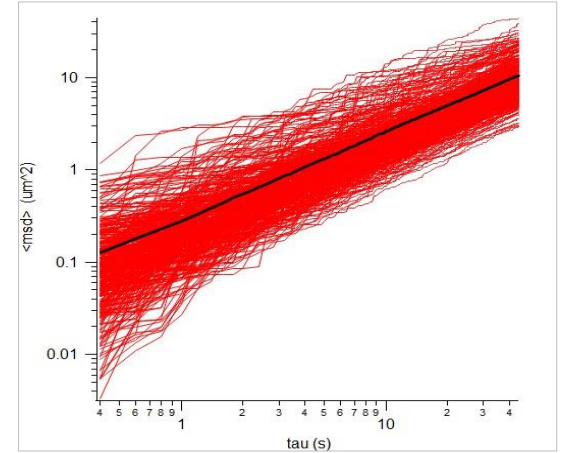


# APPLICAZIONI

## PROPRIETA' VISCO-ELASTICHE DELL'ASL



Frame	X1	Y1	X2	Y2	X3	Y3
436	651.0	221.0	651.0	221.0	1121.625	349.625
437	651.11536	220.57692	651.11536	220.57692	1122.75	350.5
438	651.25	219.91667	651.25	219.91667	1121.5	352.5
439	651.1875	222.0	651.1875	222.0	1122.5	352.0
440	652.375	221.4375	652.375	221.4375	1023.0333	430.36667
441	650.9375	222.0	650.9375	222.0	1022.4167	430.83334
442	649.55554	222.33333	649.55554	222.33333	1023.125	431.5
443	649.6053	221.3421	649.6053	221.3421	1024.1923	430.8846
444	649.7857	221.57143	649.7857	221.57143	1026.5834	431.66666
445	647.5769	220.73077	647.5769	220.73077	1025.3667	430.03333
446	647.5	219.8077	647.5	219.8077	1024.1	431.9
447	645.6539	219.96153	645.6539	219.96153	1023.7308	430.5
448	647.3125	220.6875	647.3125	220.6875	1023.03845	431.57693
449	649.1	220.56667	649.1	220.56667	1021.7857	432.35715
450	647.9375	219.5	647.9375	219.5	1021.7857	432.2143



### Cellule:

HBE (human bronchial epithelial cells)  
da pz CF con mutazione  $\Delta f508$

I video sono stati analizzati  
con software ad hoc per  
l'analisi di immagine (ImageJ  
+ Multitracker plugin) e  
"tradotti" in dati numerici

Il trattamento con farmaci  
modulatori del difetto di base della  
CFTR ha ridotto la viscosità dell'ASL

## Trasporto Transepiteliale di ioni

- TEER
- Camera di Ussing

### TEER

La misura della resistenza transepiteliale (TER) viene eseguita prima e dopo un determinato trattamento. Se un composto è in grado di aumentare il flusso transepiteliale di ioni, allora verrà misurata una diminuzione della TER

### Camera di USSING

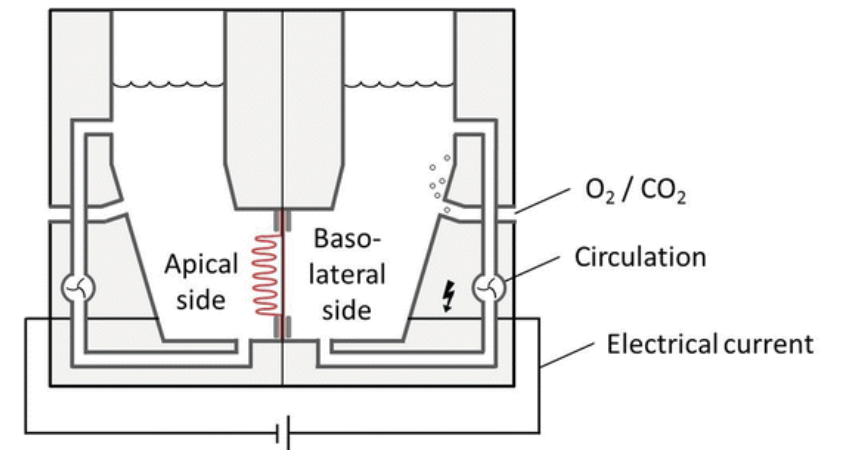
E' uno strumento che permette di eseguire misure di trasporto ionico in un epitelio

L'epitelio è mantenuto integro e vitale

La camera di Ussing è composta da una scatola divisa in due compartimenti: AP e BL.

Il trasporto di ioni attraverso l'epitelio può avvenire dalla superficie apicale a quella basale e viceversa.

Il trasporto di ioni produce una differenza di potenziale tra i due compartimenti che può venire misurata da due elettrodi opportunamente posizionati



Ussing chamber – Westerhout, Wortelboer, Verhoeckx

### VALUTAZIONE DELL'INFIAMMAZIONE

Uno stimolo pro-infiammatorio ( es presenza di batteri) induce un aumento della produzione di citochine (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL6 and IL8; PGE2 and PGE2 $\alpha$ , NO) e di molecole di adesione (ICAM-1)

L'infezione viene indotta applicando lo stimolo (es. LPS) sulla superficie AP dell'epitelio.

La risposta valutata tramite tecniche biomolecolari, biochimiche e immunocitochimiche (Western blot, ELISA, real-time PCR)

### TOSSICITA'

La risposta ad un agente tossico può essere valutata mediante:

- Colorazioni istologiche es colorazione con ematossilina-eosina)
- Eseguendo test colorimetrici (MTT )
- Valutando il danno all'epitelio (es valutazione dell'integrità strutturale con il test della fluorescena)