

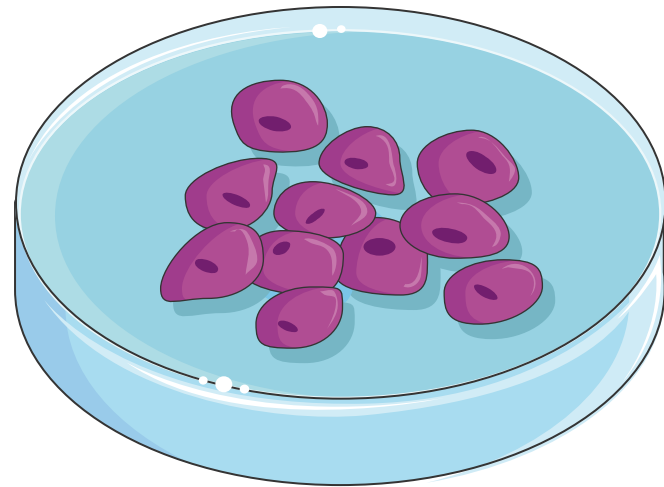


## *Modelli in vitro per studiare CFTR*

Veronica Stachetti, Elena Vitali, Angela Mitidieri, David Volgarino, Filippo Mosconi, Caterina Vitali



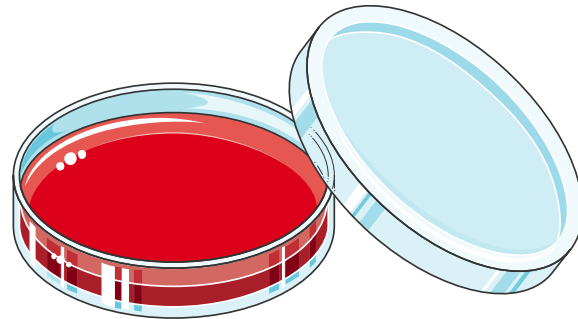
# Le colture cellulari



# Cosa sono?

Sistemi artificiali in cui le cellule isolate dall'organismo d'origine sono mantenute in vita in un ambiente controllato e ben definito

Studi *in vitro*



# Perché usare le colture?

Diverse applicazioni:

- Studi di processi cellulari fisiologici o patologici
- Studi di interazione tra organismi patogeni e cellule
- Studi degli effetti di farmaci sulle cellule
- Studi di tossicologia
- Studi sui tumori
- Produzione di vaccini
- Produzione di proteine
- Terapia cellulare
- ...

## Vantaggi

- Sistemi semplici e riproducibili
- Stretto controllo sulle condizioni ambientali
- Consentono analisi a livello molecolare
- Disponibilità di diversi tipi cellulari e reagenti per colture
- Relativamente economiche
- Ridotti problemi etici

## Svantaggi

- Sistema semplificato rispetto all'intero organismo
- Difficile correlazione tra le condizioni di coltura e le condizioni in vivo
- Possibili interazioni tra la molecola di studio e le condizioni di coltura
- Costi comunque abbastanza elevati
- Necessitano comunque di prelievo da animale o paziente

# Colture cellulari primarie

- Colture cellulari derivate dalla dissociazione di un tessuto o un organo o isolate da fluidi biologici
- Dissociazione:
  - meccanica
  - enzimatica (tripsina, collagenasi, EDTA)

Distrugge la matrice cellulare che tiene unite le cellule si ottiene una sospensione di materiale extracellulare e cellule.

# Linee cellulari immortalizzate

- Cellule tumorali o cellule non tumorali trasformate, dette anche linee cellulari immortalizzate
- Il programma genetico della senescenza è stato annullato:
  - Mutazioni spontanee: cellule derivate da tumori o trasformazione in coltura di cellule da colture secondarie
  - Trasformazione indotta:
    - Cellule da colture primarie immortalizzate tramite manipolazione genetica
    - Agenti fisici (radiazioni o mutageni chimici)
    - Virus codificanti porzioni di genoma modificate

## Colture primarie

- Limitato numero di cicli cellulari (telomeri)
- Mantengono con maggiore probabilità le caratteristiche delle cellule in vivo
- Continui prelievi da animali/pazienti, scarsa disponibilità del materiale di partenza
- Condizioni di coltura più delicate
- Maggiore variabilità (isolate da soggetti diversi)

## Linee immortalizzate

- Proliferazione rapida e continua dipendente solo dalla presenza di metaboliti
- Possono acquisire caratteristiche diverse dalle cellule in vivo (morfologia, fisiologia e corredo cromosomico)
- Rischi di induzione di instabilità genetica, alterata espressione genica legata alle strategie di immortalizzazione
- Disponibili commercialmente
- Coltura più semplice (minori esigenze trofiche, ridotta inibizione da contatto)
- Variabilità ridotta



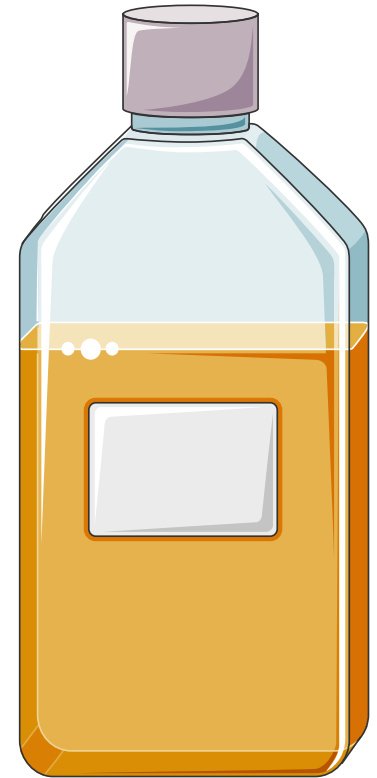
# Come facciamo a mantenere le cellule in vitro?

Dobbiamo mimare le condizioni dell'organismo di provenienza:

- pH
- Temperatura
- Nutrienti e fattori di crescita
- pO<sub>2</sub> e pCO<sub>2</sub>
- Umidità
- Sterilità

# I terreni di coltura

- Soluzioni sterili isotoniche e tamponate in grado di fornire tutte le sostanze fondamentali per la sopravvivenza e crescita delle cellule
  - Concentrazioni diversa a seconda del tipo cellulare
  - Acqua
  - Sali minerali
  - Fonte di carbonio (glucosio e/o glutammina)
  - Amminoacidi
  - Vitamine
  - Indicatore di pH
- + siero bovino fetale (FBS)



## Colture in adesione

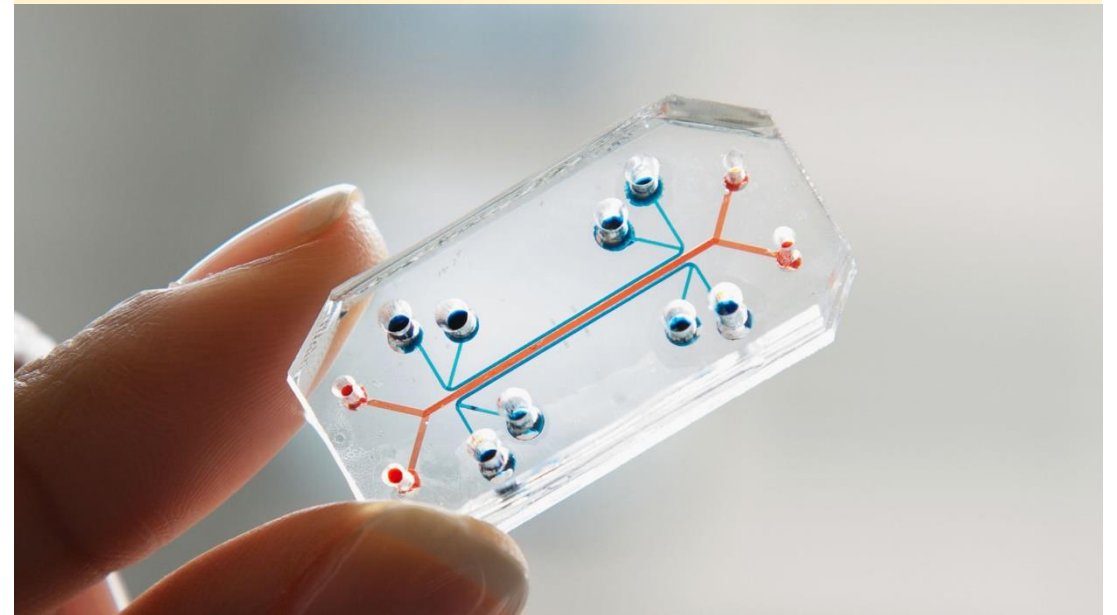
- Cellule da tessuti solidi
- Adesione necessaria per la sopravvivenza e la proliferazione

## Colture in sospensione

- Le cellule stanno in sospensione nel mezzo di coltura
- Es cellule emopoietiche

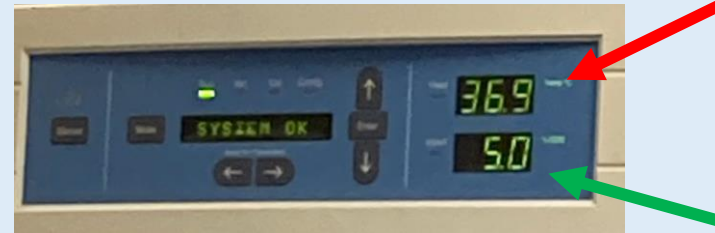
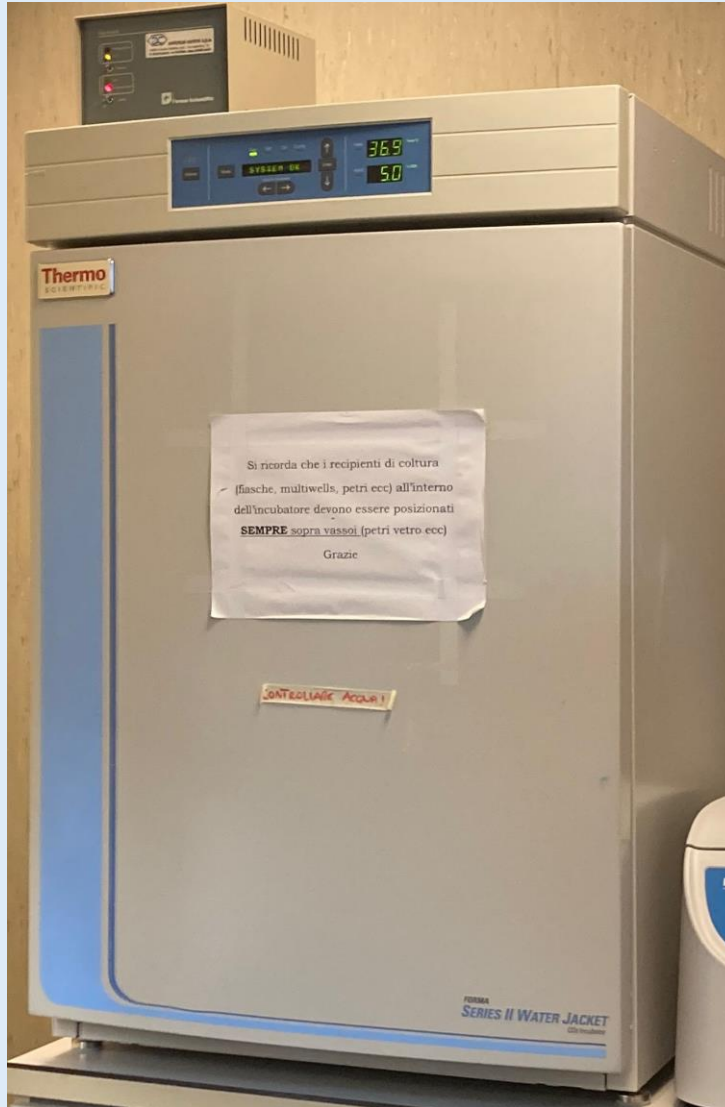
- Colture di cellule aderenti: le cellule in adesione crescono in monostrato 2D fino alla confluenza (inibizione da contatto) => propagazione (passaggio)

- Sistemi di coltura cellulare 3D
  - Scaffold sintetici, capsule di idrogel, biostampanti
  - Organoidi
  - Organ-on-chip



# LA CAMERA STERILE

incubatore



**TEMPERATURA = 37°**

**UMIDITA'** = 95% (vogliamo evitare evaporazione liquidi che vada ad alterare l'osmolarità)

**CO<sub>2</sub>** = 5% (importante sistema per controllo del pH)

**CHIUSURA ERMETICA**

# LA CAMERA STERILE

Cappa a flusso laminare



- **Flusso d'aria laminare:** aria in entrata passa attraverso filtri HEPA (bloccate particelle con diametro superiore ai 0.3 micrometri)
- **RAGGI UV** (quando non in uso!)

LA CONTAMINAZIONE PORTA AL DANNEGGIAMENTO DELLE CELLULE E A RISULTATI ALTERATI DEGLI ESPERIMENTI

# LA CAMERA STERILE



**Microscopio ottico invertito**



**frigorifero**



**Bagno termostatico**

# LA PLASTICHERIA

- Polistirene
- Monouso
- Trasparenti
- Possono essere trattate per l'adesione (carica negativa)

**FIASCHE:** contenitori con imboccatura stretta chiusa con tappo a vite (possono avere il tappo con filtro)



**CAPSULE PETRI:** semplici piastre di più facile manipolazione e più economiche delle fiasche



**PIASTRE MULTIWELLS:** per esempio utili per fare screening (piastre 96 wells)





# LA PLASTICHERIA



# MODELLI CELLULARI UTILIZZATI

Cellule primarie:

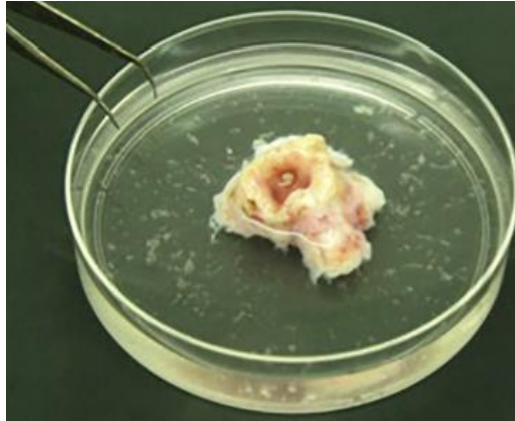
- **HBE**: human bronchial epithelial cell

Linee cellulari immortalizzate:

- **Calu3**: human lung adenocarcinoma cells
- **CFBE41o-** :human bronchial cells che esprimono la mutazione F508del

# DAL TESSUTO ALLE CELLULE PRIMARIE

- Biopsia
- Espianto

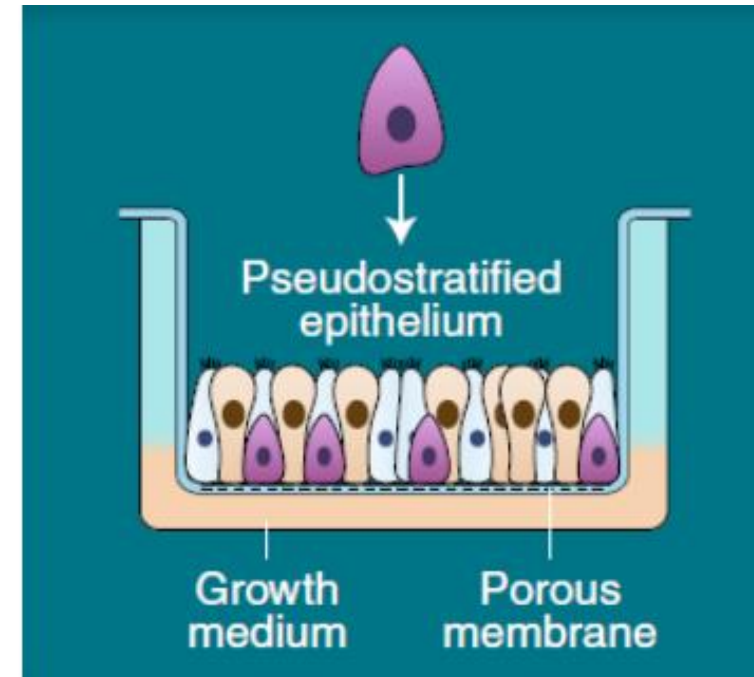


1. Il tessuto viene tagliato meccanicamente con bisturi e omogenizzatore
2. La matrice viene digerita con tripsina
3. Una volta ottenuta la sospensione cellulare si mettono subito in coltura

# MODELLO 2D IN VITRO DI EPITELIO RESPIRATORIO

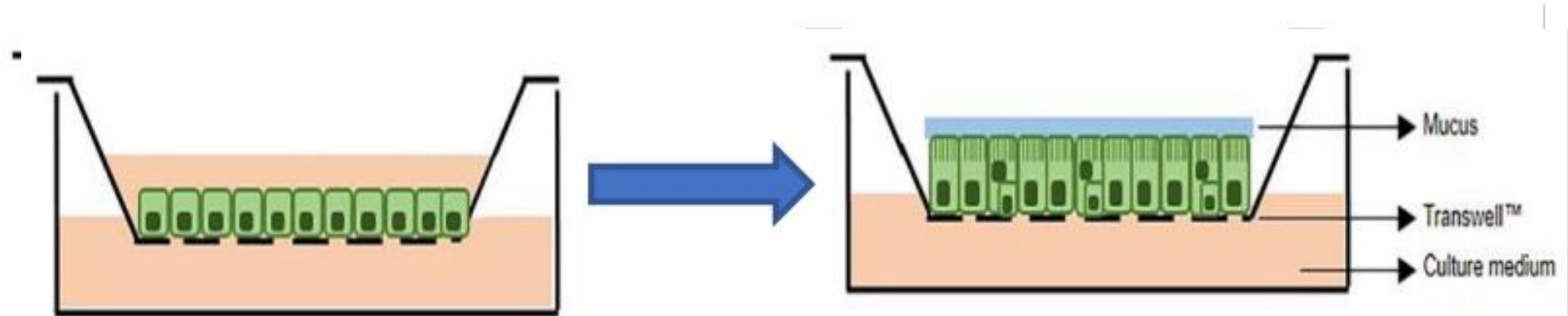
Sono costituiti da:

- Cellule basali
- Cellule ciliate
- Cellule mucipare



# CONDIZIONI DI COLTURA MODELLI 2D:

- Condizione sommersa
- Interfaccia aria-liquido (ALI)



# COME SI ALLESTISCE UN MODELLO 2D DI EPITELIO RESPIRATORIO?

## 1) Scongelamento delle cellule

- 37°C rapidamente
- 1000 rpm x 5
- Rimozione DMSO
- Aggiunta di DMEM F12+Glutamina+fattori di crescita+BSA



## 2) Espansione delle cellule in fiasca T75

### 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
- Taglio in un numero indefinito

### 3) Semina delle cellule su supporto poroso

Transwell Corning 3397



200.000 cellule

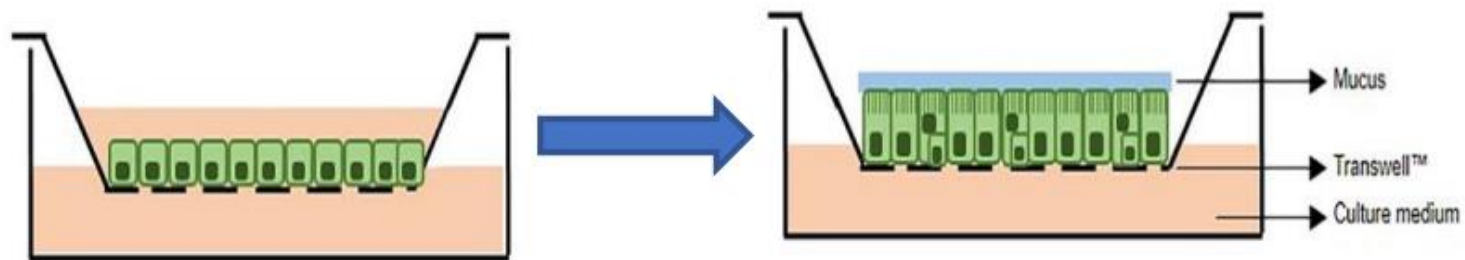
Snapwell Corning 3081



500.000 cellule

Filtro: Poliestere, pori da

### 4) Differenziamento cellulare e maturazione nella condizione ALI



## 5) Formazione di un epitelio polarizzato maturo

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

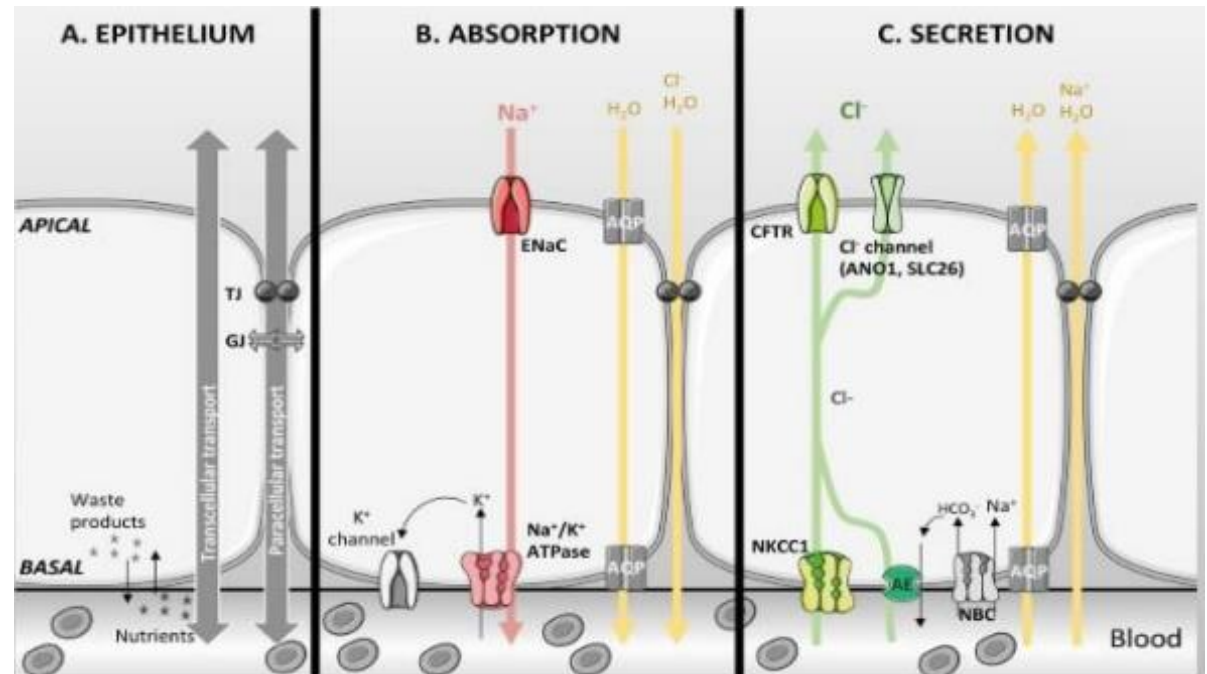


si osserva una organizzazione morfo-funzionale diversa delle cellule sulle due facce dell'epitelio.

Superficie apicale asciutta → nessun passaggio del mezzo di coltura dal comparto BL a quello AP

Presenza di:

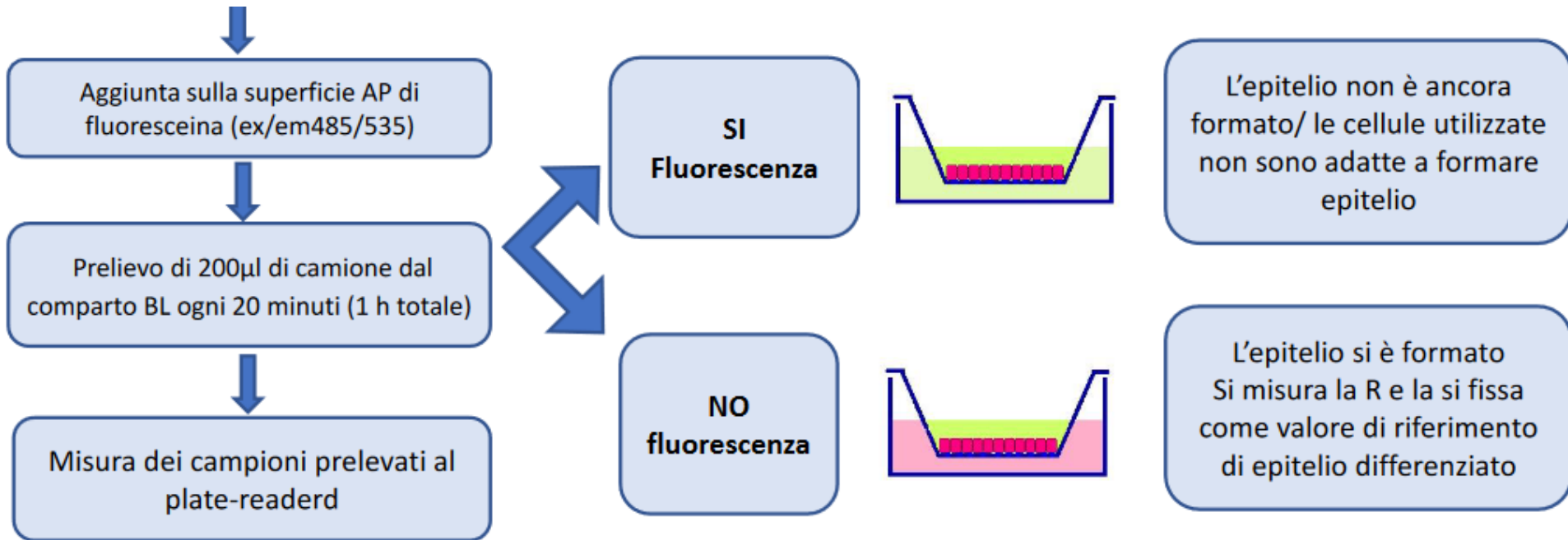
- tight junctions
- ciglia
- produzione di muco





# Valutazione dello stato di Maturazione

- Test della permeabilità



# Valutazione dello stato di Maturazione

- Test al voltmetro

TEER(transepithelial electrical resistance)

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

Con gli elettrodi si valuta la corrente e dalla legge di Ohm si ricava la Resistenza, da comparare a dati di letteratura da epiteli caratterizzati.

*Esempio: la resistenza di un epitelio maturo composto da cellule CALU3 dovrebbe essere di  $1000 \Omega\text{cm}^2$*



# Valutazione dello stato di Maturazione

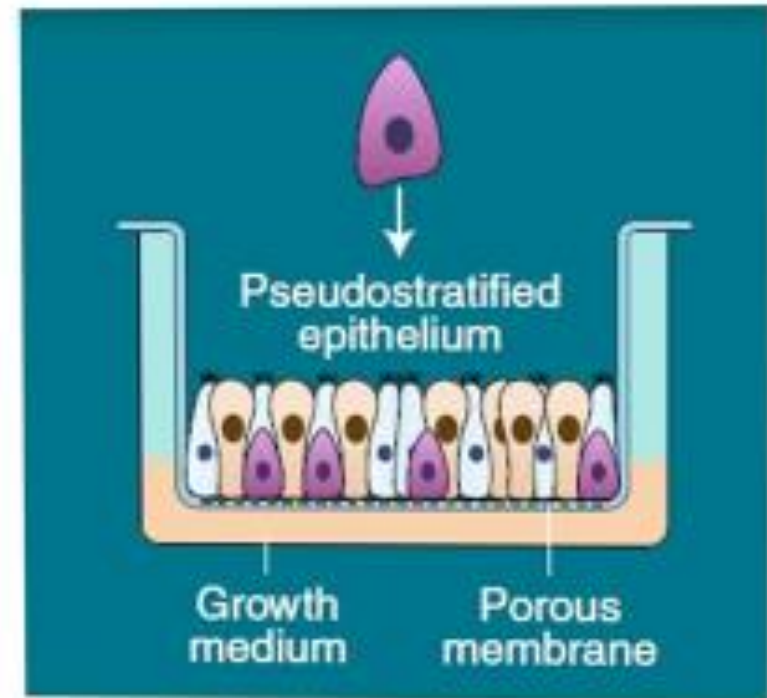
- SE l'epitelio non è precedentemente caratterizzato
- Trattamento con *fluorescina* e test della permeabilità in combinazione con il test della Resistenza.

# Test su culture ALI

Si possono effettuare Test funzionali a seguito di somministrazioni farmacologiche o comparativi (WT vs mutazione del paziente)

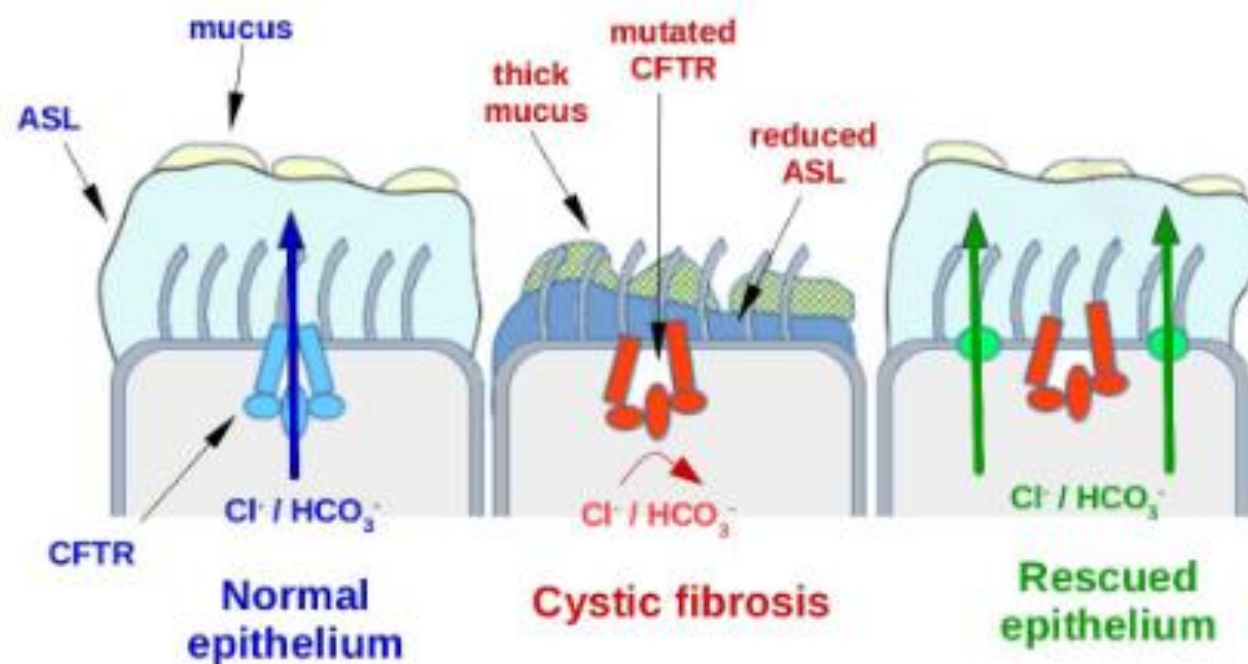
- Test dell'integrità
- Test al voltmetro
- Test dello iodio

Ma anche...



# Test su culture ALI

- Test del trasporto paracellulare (si seguono al voltmetro le correnti di Cl)



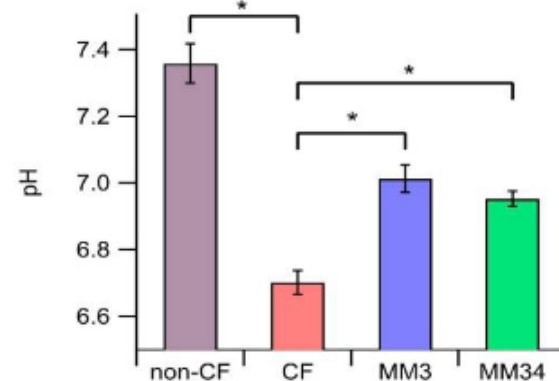
Volume di campione ( $\mu\text{L}$ ) < riassorbimento ( $\mu\text{L}/\text{h}(\text{cm}^2)$ )

# Test su culture ALI

- Test dell'attività ciliare (foto al microscopio elettronico o fluorimetria su beads tagged)
  - Test sull'infiammazione (somministrazione di patogeni o antigeni, si usano trans-well per il dot blot, o wb con il prodotto BL delle snap-well)
  - Test su prodotti epiteliali fisiologici (muco)
- Test al phametro
- Test della viscosità (MPT)

## Cellule:

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



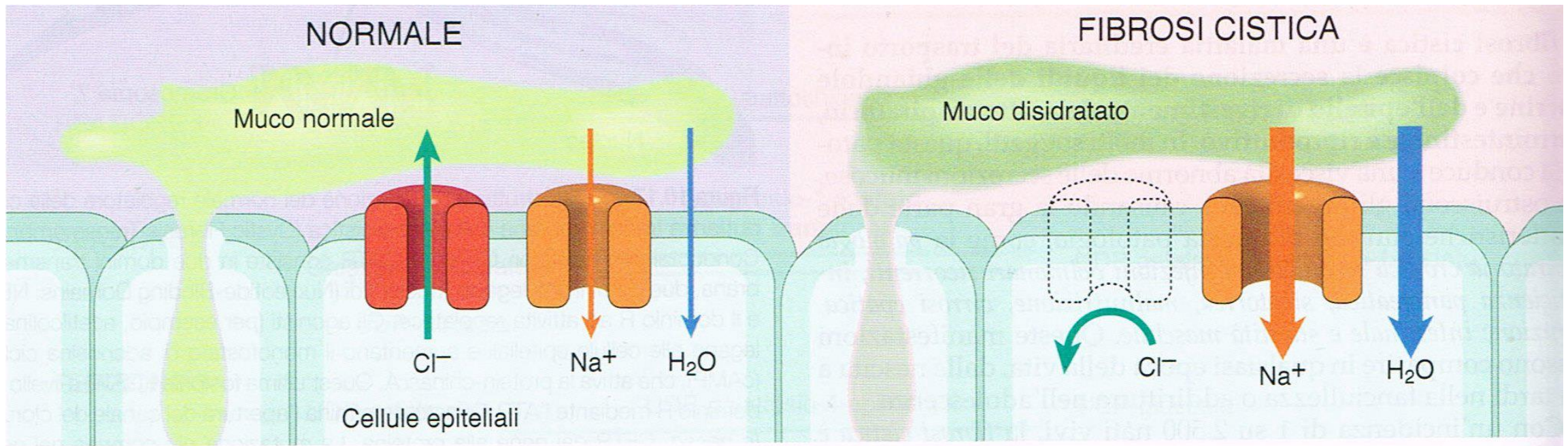
## Tecnica di video-microscopia

### MPT – MULTIPLE PARTICLE TRACKING

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

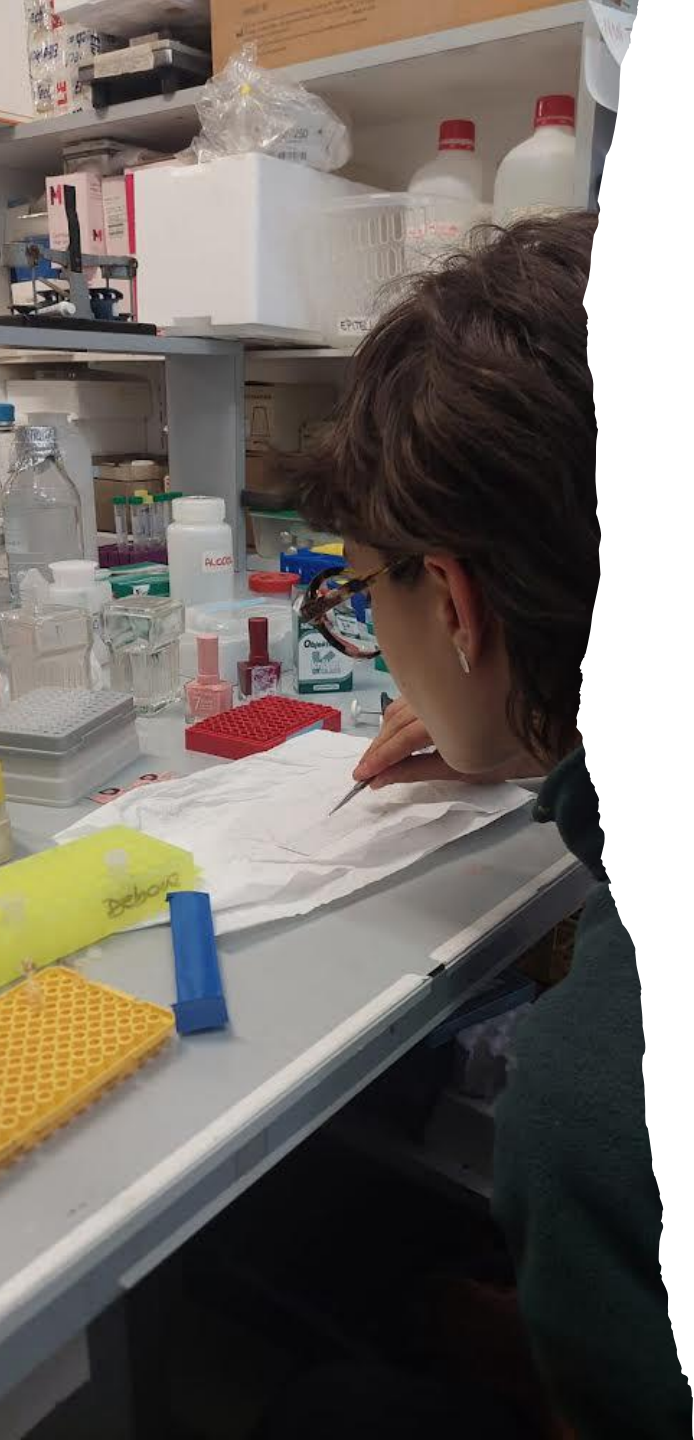
Utilizza piccoli volumi di campione

Chi soffre di fibrosi cistica produce un muco denso e appiccicoso che, anziché umidificare la superficie con cui è a contatto, si deposita bloccando prime fra tutte le vie respiratorie



# PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1. Scongellamento del muco
2. Vengono prelevati 40  $\mu$ l di muco e 10  $\mu$ l di nano biglie fluorescenti e inserite in una Eppendorf
3. Viene messa una goccia da 8  $\mu$ l sul vetrino
4. Copertura del campione
5. La goccia viene circoscritta da smalto
6. Dopo 20 minuti si osserva al microscopio a fluorescenza





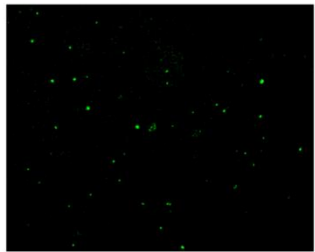


**Preparazione del campione:**

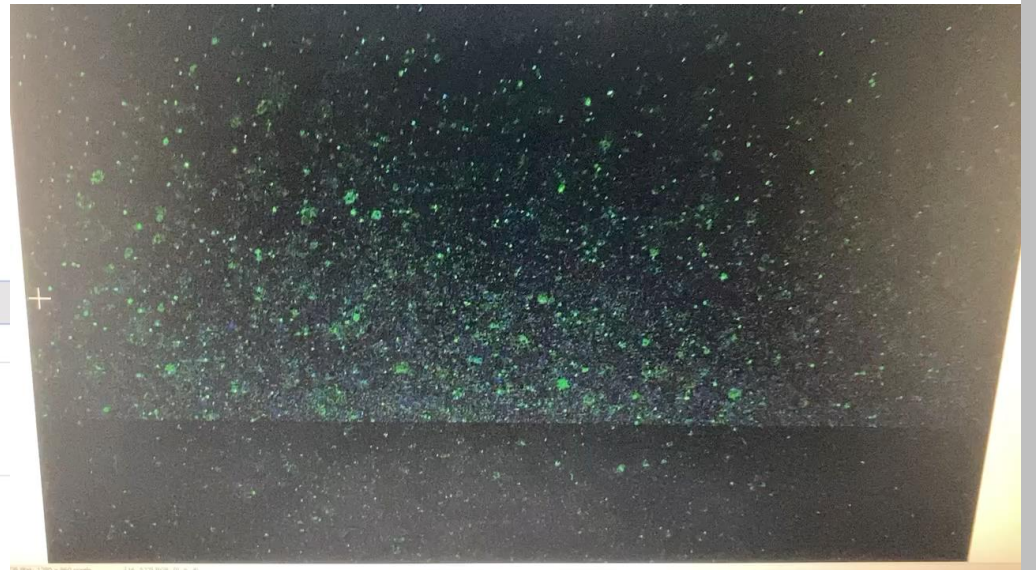
Nano-biglie fluorescenti (200nm  $\varnothing$ ) + campione di ASL

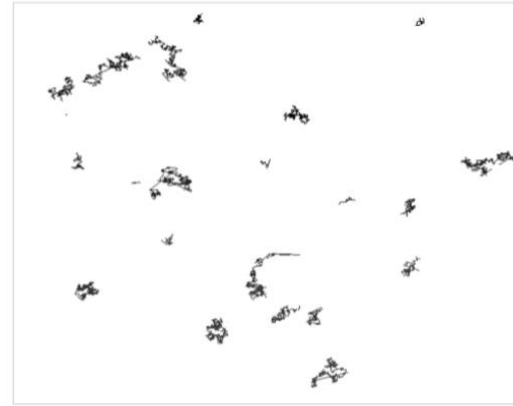
Video recording con una videocamera CCD montata su un microscopio a fluorescenza

Le biglie all'interno del fluido si muovono con moto casuale (Browniano)

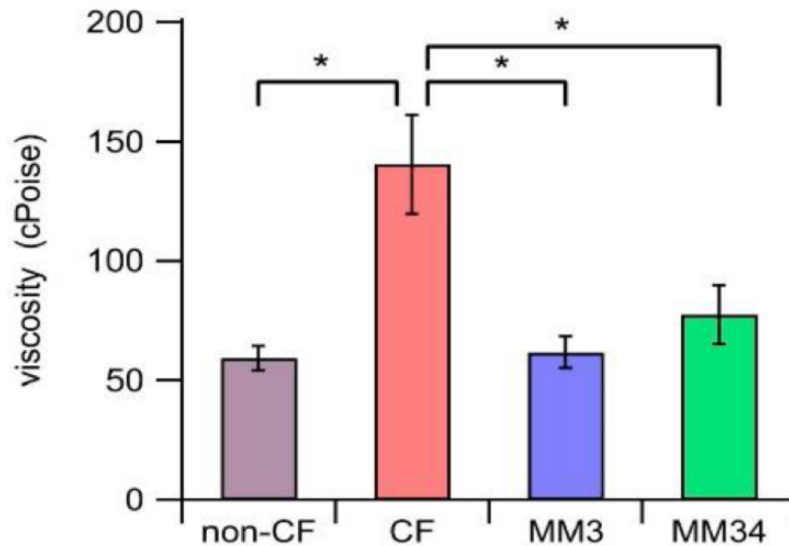
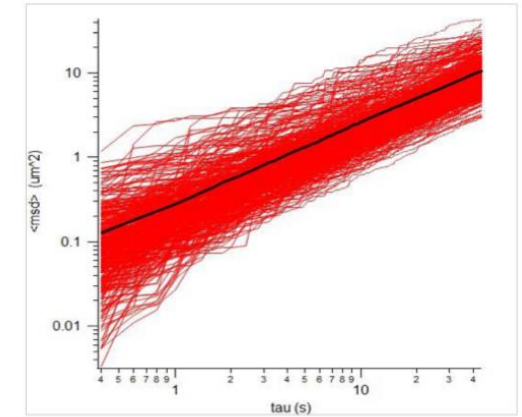


Traiettoria di una nano-biglia





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

Open Access

Article

# Modulator Combination Improves In Vitro the Microrheological Properties of the Airway Surface Liquid of Cystic Fibrosis Airway Epithelia

by Alessandra Ludovico, Oscar Moran  and Debora Baroni \*  

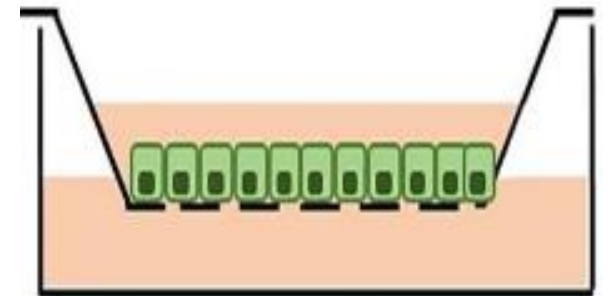
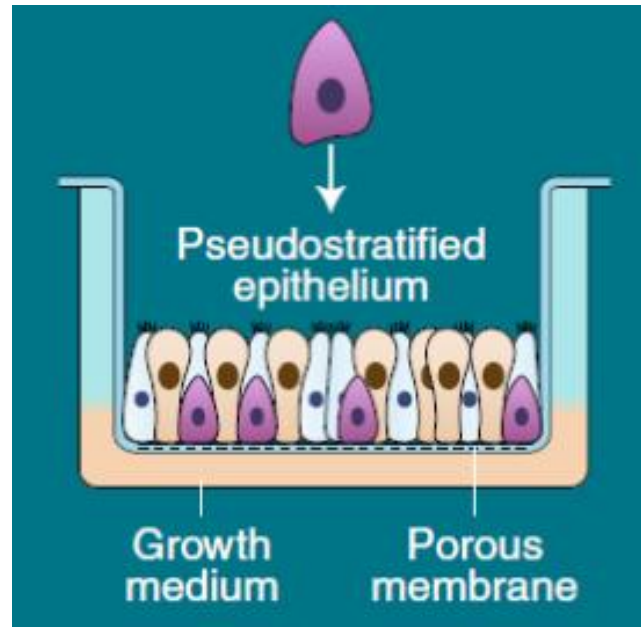
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231911396>

# Apparato sperimentale

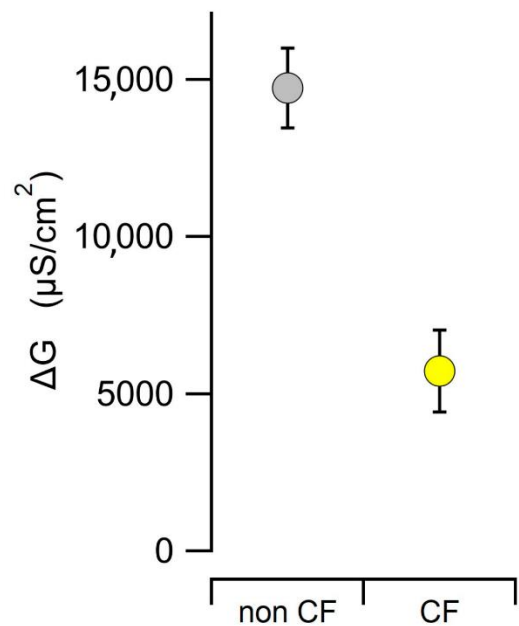
Colture cellulari da:

- Non-CF HBEC
- F508del/F508del HBEC

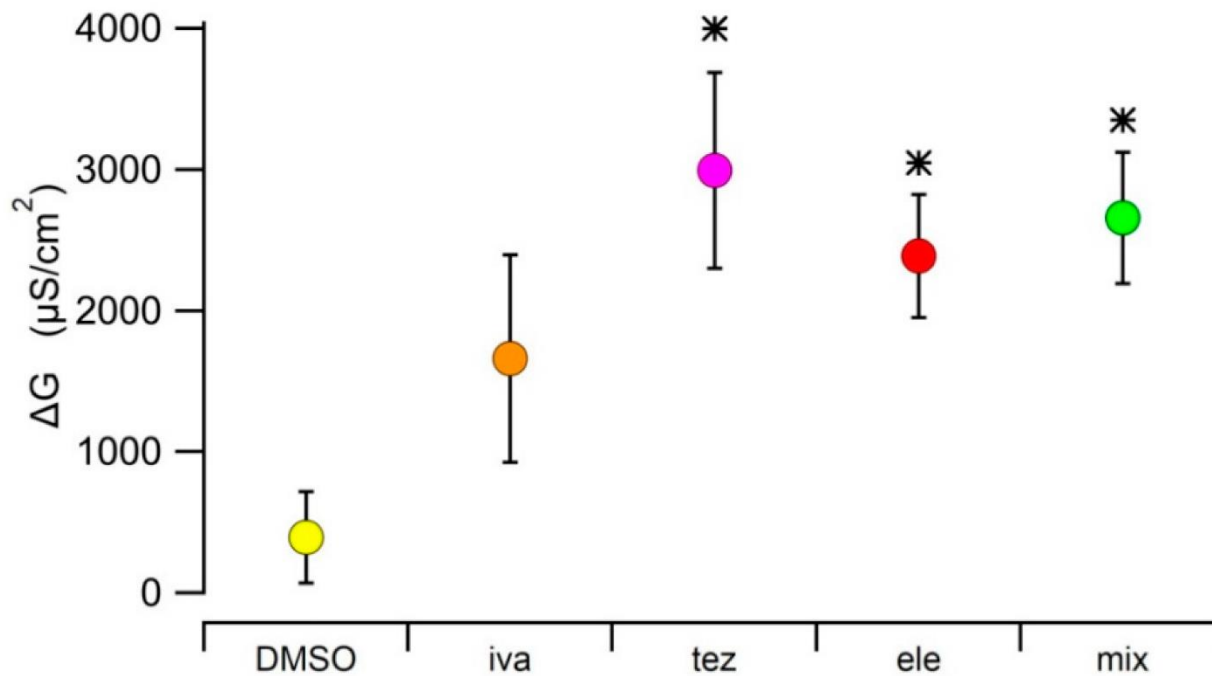
Allestito **modello 2D** in vitro di epitelio respiratorio



# Trasporto transepiteliale ioni



(a)

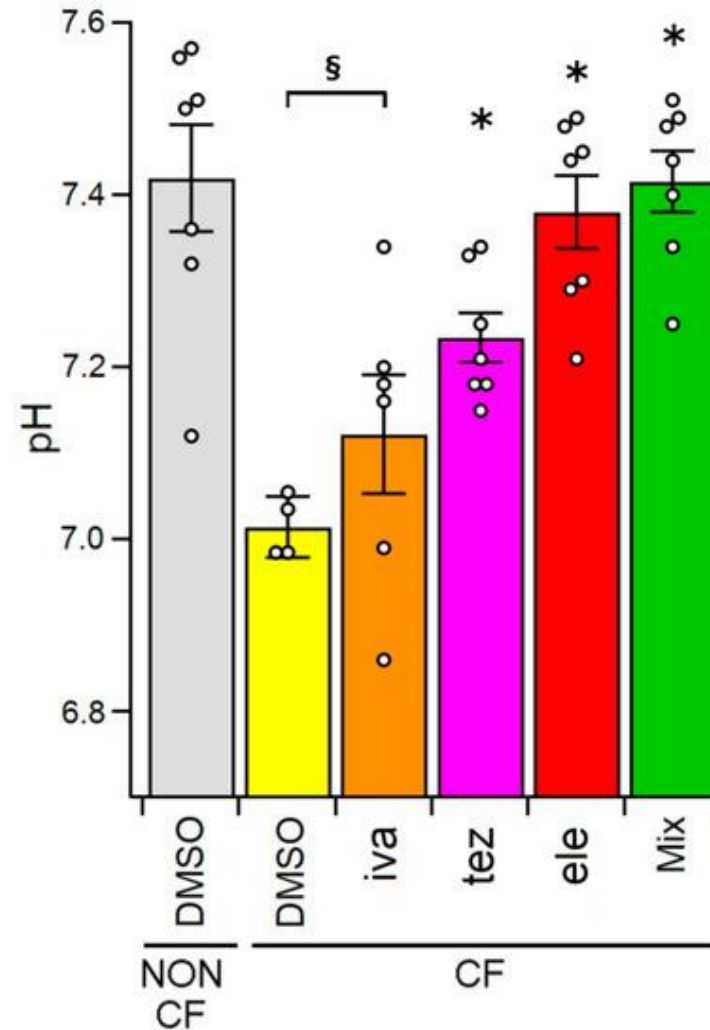


(b)

**Tecnica utilizzata:**

Misurazione TEER con voltmetro

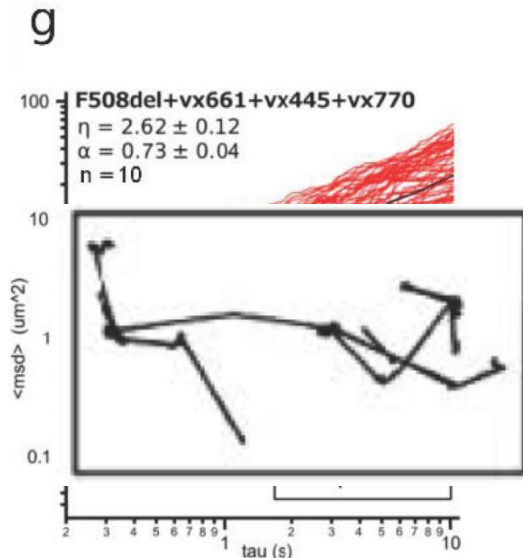
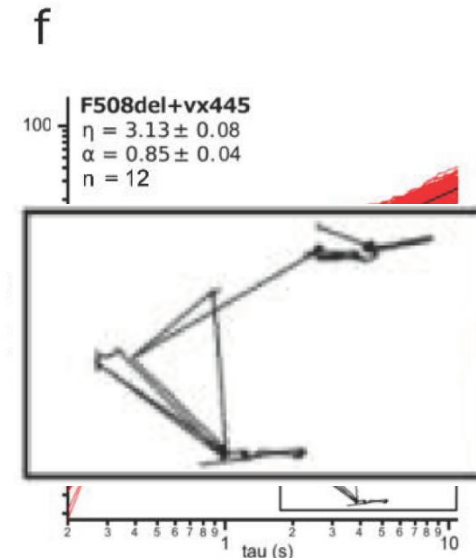
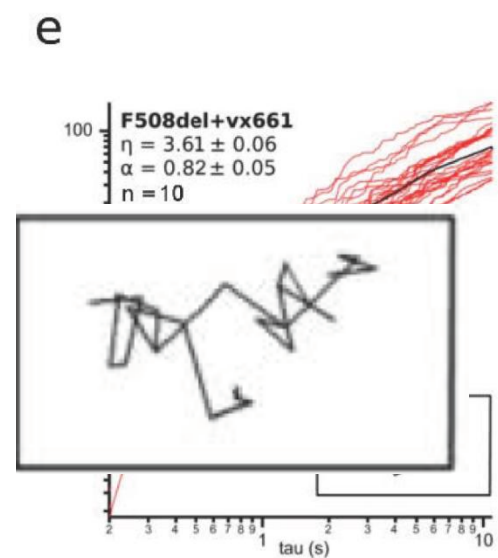
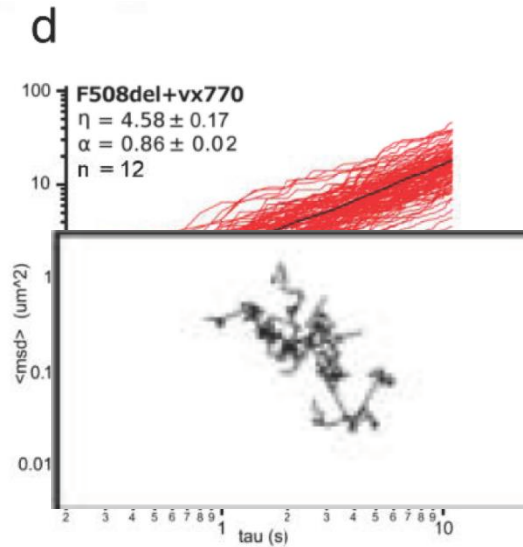
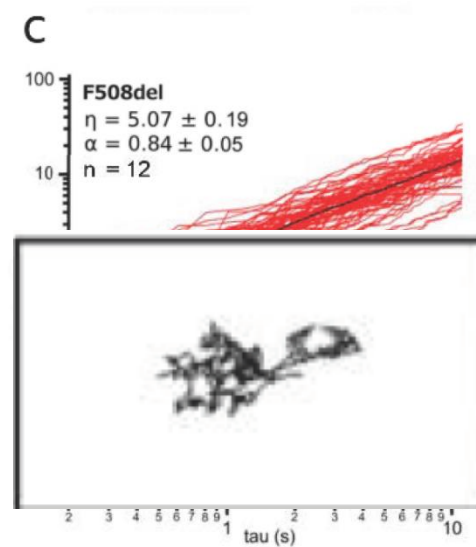
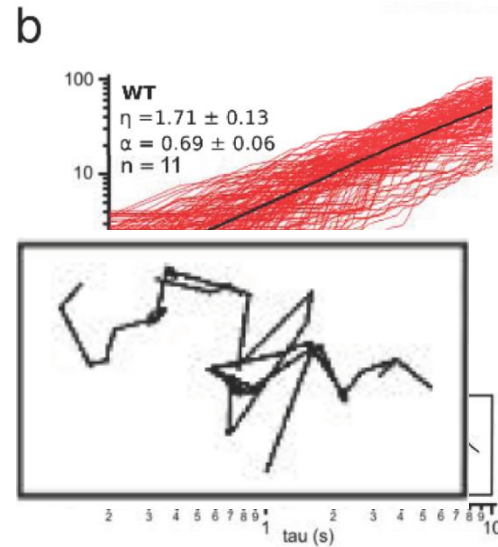
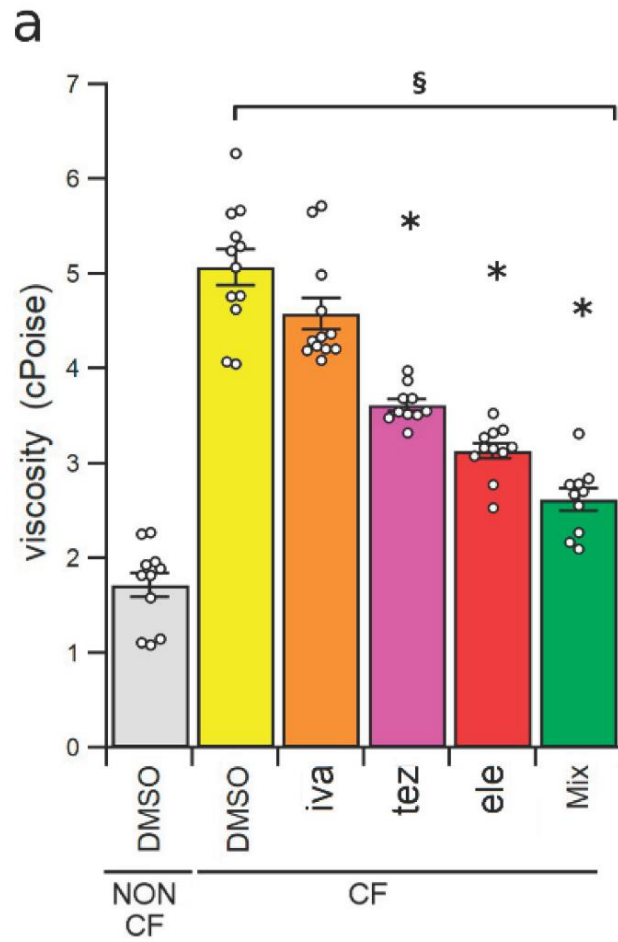
# Proprietà chimico-fisiche dell'ASL: pH



**Tecnica utilizzata:**

Raccoglimento muco e misurazione pHmetro

# Proprietà visco-elastiche dell'ASL



**Tecnica utilizzata:**

MPT: Multiple Particle Tracking