

Ospedale San Raffaele

Laboratorio di ricerca CFaCore (Cystic Fibrosis animal Core Facility)
Unità di Infezioni e Fibrosi Cistica - GRUPPO 4

Veronica Nicole Barca, Elisa Bravi, Elisa Diani, Valentina Ghezzi, Chiara Iezzi,
Kleanta Lleshi, Beatrice Muzio, Francesca Santamaria, Mariya Tempestilli



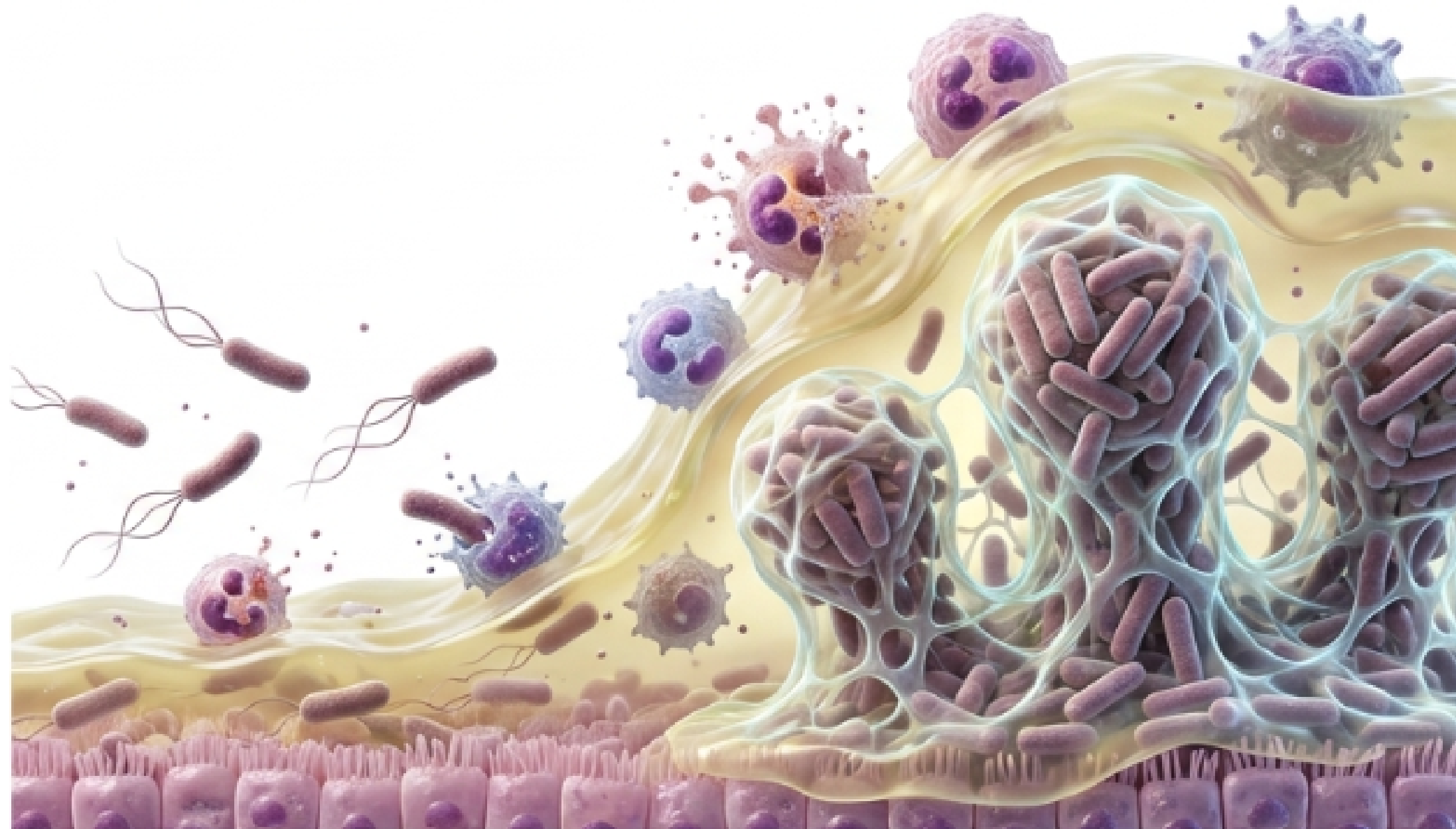
DAL LABORATORIO ALLA PATOLOGIA: PERCHÉ LA FC FAVORISCE L'INFEZIONE

- **Mutazione CFTR** compromette il canale del cloro.
- Eccessivo riassorbimento di ioni e acqua, causando deplezione del liquido periciliare.
- Formazione di muco denso e viscoso che blocca la **clearance mucociliare**.
- Il lume bronchiale diventa un ambiente stagnante ideale per patogeni (**P. aeruginosa** e **S. Aureus**).



PROGRESSIONE DELL'INFEZIONE: DALLA FASE ACUTA ALLA CRONICITA'

- **Fase acuta:** i batteri colonizzano le vie aeree in forma libera, innescando l'infiammazione iniziale.
- **Fase cronica:** si ancorano al muco denso e producono una matrice protettiva (**biofilm maturo**).
- Resistenza agli **antibiotici** e al **sistema immunitario**.
- L'infezione perpetua l'infiammazione e accelera il **danno polmonare**.



ETICA E RICERCA IN VIVO

> Nessun modello in-vitro può riprodurre l'interazione immunitaria, la farmacocinetica sistemica e la tossicità multiorgano tipiche della fibrosi cistica.

✓ **Sicurezza e Tutela Umana:** I protocolli bioetici vietano il salto clinico diretto dalle colture d'organo ai pazienti senza validazione di tossicità in vivo.

✓ **Dovere Morale di Cura:** Trattandosi di una malattia multiorgano degenerativa e letale, arrestare la pre-clinica negherebbe la speranza di trattamenti salvavita.

✓ **Rispetto dell'Animale:** Riconoscere il valore della vita animale impone il massimo rigore nell'evitare qualsiasi forma di stress o sofferenza evitabile.



DILEMMA BIOETICO E REGOLA DELLE 3R



1. Replacement

Sostituzione dei modelli animali quando possibile;

Impiego di metodologie alternative avanzate come organoidi, colture cellulari tridimensionali e modelli computazionali/in silico.



2. Reduction

Riduzione al minimo indispensabile del numero di animali utilizzati in ciascun protocollo di ricerca; ottimizzazione del disegno sperimentale e l'analisi statistica evitando ripetizioni superflue.



3. Refinement

Ottimizzazione delle procedure chirurgiche, anestetiche e di stabulazione con lo scopo di minimizzare il dolore, lo stress e la sofferenza degli animali, garantendo i più alti standard di benessere.

MODELLI ANIMALI: perchè servono e perchè sono difficili da ottenere



Limiti del topo:

- ➞ grave difetto gastrointestinale
- ➞ scarsa produzione patologia respiratoria
- ➞ assenza di infezione spontanea da patogeni
- ➞ NON possiamo testare nuovi antibiotici/antinfiammatori senza cronicità

1. CEPPI CLINICI ADATTATI

- Isolati precoci → poco adattati, non mantengono la cronicità.
- Isolati tardivi → altamente adattati, capaci di stabilire infezione cronica.

2. RICOSTRUZIONE DEL MUCO FC IN VITRO

- Sfere di agar con batteri che mimano il muco FC
- Dopo iniezione nel topo → inducono biofilm, richiamano cellule immunitarie, generano infezione cronica stabile.

IL MODELLO MURINO



Biologia e Genetica

- ▷ **Sterilità Assoluta:** Utilizzo esclusivo di topi SPF per garantire il miglior compromesso per un sistema immunitario sovrapponibile a quello umano.
- ▷ **Rinfresco della Colonia:** Re-importazione periodica di linee genetiche pure per prevenire l'inbreeding e scongiurare derive o mutazioni.
- ▷ **Selezione di Genere (Maschi):** Esclusione delle femmine nei trial a lungo termine per eliminare l'impatto delle oscillazioni ormonali sull'infezione.
- ▷ **Analogia Clinica:** Nella FC murina l'infertilità colpisce la femmina, mentre nell'essere umano è tipica del maschio (ulteriore criterio di scelta per i maschi).

Standardizzazione dei Bias

- ▷ **Parametri Clinici:** Monitoraggio rigoroso e costante di età, peso e stato del pelo prima e dopo l'infezione per valutare l'idoneità clinica.
- ▷ **Allineamento Circadiano:** Misurazioni effettuate agli stessi orari per non alterare i parametri biologici sensibili ai bioritmi giornalieri.
- ▷ **Sincronizzazione dei Gruppi:** Rotazione quotidiana del gruppo sperimentale di partenza per azzerare l'errore umano dovuto alla stanchezza dell'operatore a fine turno.
- ▷ **Rilevanza Statistica:** Massima standardizzazione dei processi per produrre dati robusti, riproducibili ed evitare la ripetizione non etica dei test.



OBIETTIVI DEGLI STUDI PRECLINICI

OBIETTIVO	PERCHÈ?
ADME	La sola sperimentazione <i>in vitro</i> non è sufficiente metabolismo epatico 
Via di somministrazione e dose	Individuare il potenziale dosaggio
Efficacia	Dipende dalla molecola e dalla fase di somministrazione
Sicurezza ed effetti collaterali	Il caso BIIL284

INFEZIONE ACUTA VS CRONICA

FENOTIPO ACUTO

- Batterio motile e virulento
- Presenza di pili e flagelli
- Forte riconoscimento immunitario
- Disseminazione rapida



ADATTAMENTO NEL POLMONE FC

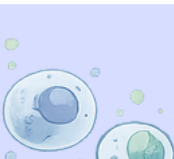
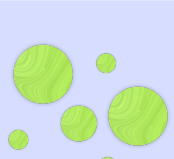
- Muco denso
- Infiammazione cronica
- Trattamenti antibiotici ripetuti

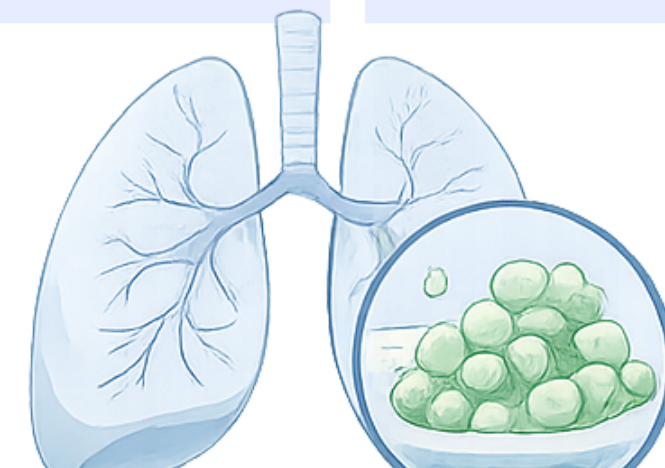


FENOTIPO CRONICO

- Perdita di pili e flagelli
- Ridotta motilità
- Formazione di biofilm e macrocolonie
- Evasione immunitaria
- Persistenza nel polmone

Nella fibrosi cistica *Pseudomonas aeruginosa* rappresenta uno dei **principali patogeni opportunisti** coinvolti nelle infezioni respiratorie croniche

	INFEZIONE ACUTA	INFEZIONE CRONICA
	Motili	Poco motili
	Pili e flagelli	Biofilm
	Forte riconoscimento immunitario	Evasione immunitaria
	Rapida disseminazione	Persistenza nel polmone
	Infezione temporanea	Colonizzazione stabile



QUALE CEPPLO SCEGLIERE?



PAO1 / BO1 – CEPPLO DA LABORATORIO

- Ceppo tipico di infezione acuta
- Altamente motile, molto virulento e ricco di pili e flagelli
- Ideale per studiare infezioni acute, ma tende a **non persistere nel tempo**



RP73 – CEPPLO CLINICO CRONICO

- Isolato da infezioni croniche in pazienti CF
- Adattato al muco denso e all’infiammazione cronica
- Forma biofilm, **persiste più a lungo** nel polmone
- Evade meglio la risposta immunitaria

EVIDENZE NEL MODELLO MURINO

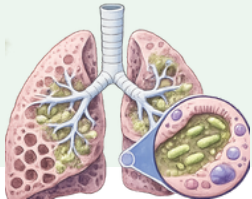


- RP73 → maggiore persistenza
- Minore motilità rispetto a PAO1
- Lesioni polmonari più severe
- Modello più realistico della fibrosi cistica umana

CARATTERISTICA	PAO1/BO1 (Ceppo da laboratorio)	RP73 (Ceppo clinico cronico)
Tipo di infezione	Acuto	Cronico
Motilità	Motile	Adattato / Poco motile
Pili e flagelli	Presenti	Ridotti / Assenti
Livello di virulenza	Alta virulenza	Alta persistenza
Formazione di biofilm	Bassa	Elevata
Persistenza nel polmone	Non persiste a lungo	Persiste a lungo
Interazione con il sistema immunitario	Forte riconoscimento	Evasione immunitaria
Utilizzo nei modelli sperimentali	Studi su infezioni acute	Modelli di infezione cronica nella fibrosi cistica

Per questo motivo **RP73 è il ceppo di scelta nei modelli di infezione cronica**

Riproduce in modo più realistico ciò che accade nei pazienti con fibrosi cistica

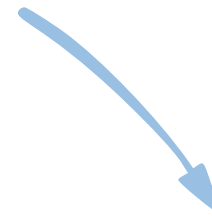


PROTOCOLLO DA SEGUIRE PER CREARE MODELLI ARTIFICIALI DI INFEZIONE CRONICA

Utilizzato per simulare la fibrosi cistica

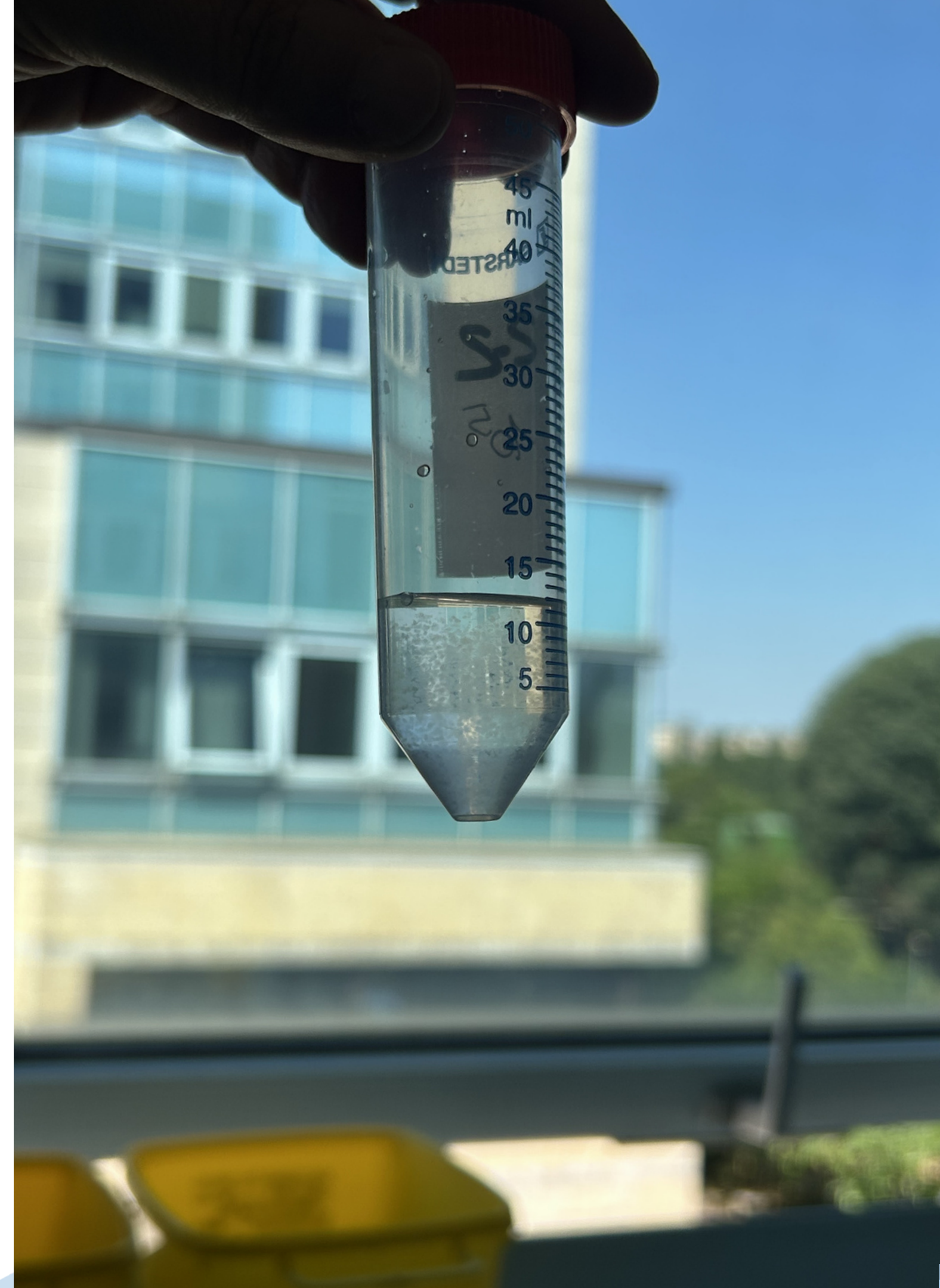
Necessari 2 elementi fondamentali:

- Ceppi batterici adattati → ex. RP73
- Microambiente simile a quello presente nel polmone FC



COME? TRAMITE LA **TECNICA DELLE AGAR BEADS**

AGAR BEADS → piccole sfere di agar che intrappolano i batteri e ricreano le condizioni simili al muco polmonare, favorendo un'infezione cronica



Tecnica delle AGAR BEADS

Procedura complessa, richiede precisione

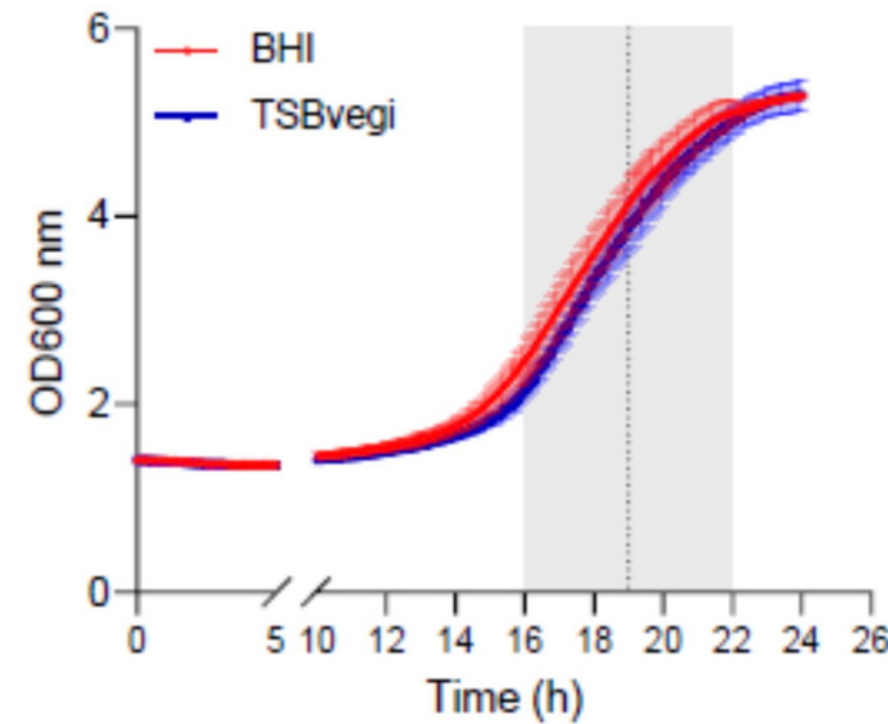
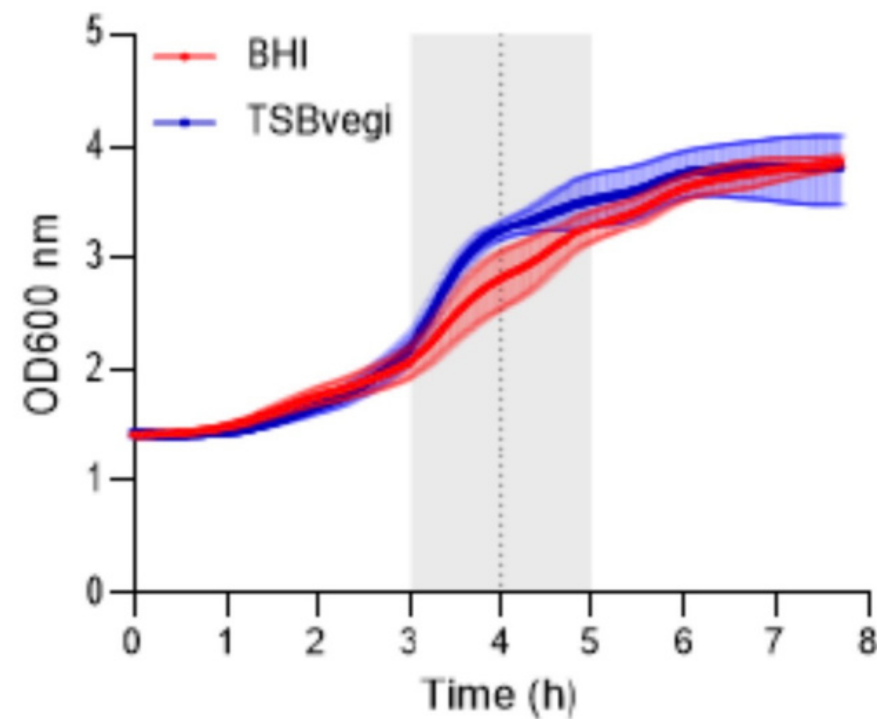
1	Crescita dei batteri
2	Rinfresco della coltura
3	Formazione delle beads
4	Lavaggio e quantificazione
5	Inoculo nel modello animale

Crescita di colonie batteriche di *P. aeruginosa* su agar.

- **1 colonia batterica viene inoculata in terreno liquido e lasciata crescere overnight a 37°C in agitazione** → Ottengo una coltura in sospensione

La mattina successiva, **la coltura viene diluita** (per misurare la densità ottica e quindi valutare la concentrazione batterica) e **trasferita in terreno fresco** per mantenere i batteri in **FASE ESPONENZIALE** → fase di crescita attiva in cui sono più vitali e adatti a formare infezione stabile

Grafici mostrano le curve di crescita batterica utilizzate per monitorare la fase esponenziale dei batteri durante il protocollo di preparazione delle agar beads



Densità ottica a 600 nm →
rappresentazione indiretta
della concentrazione batterica
in coltura

Tempo di incubazione

Le 2 curve confrontano la crescita di *P. aeruginosa* in 2 differenti terreni di coltura:

- BHI (in rosso),
- TSB vegetale / TSBvegi (in blu).

Le **aree grigie** evidenziano proprio la **finestra temporale della fase esponenziale**, cioè il momento ottimale in cui i batteri vengono raccolti per il protocollo delle agar beads.

A SINISTRA → **crescita nelle prime ore
di incubazione**

A DESTRA → **crescita più prolungata**

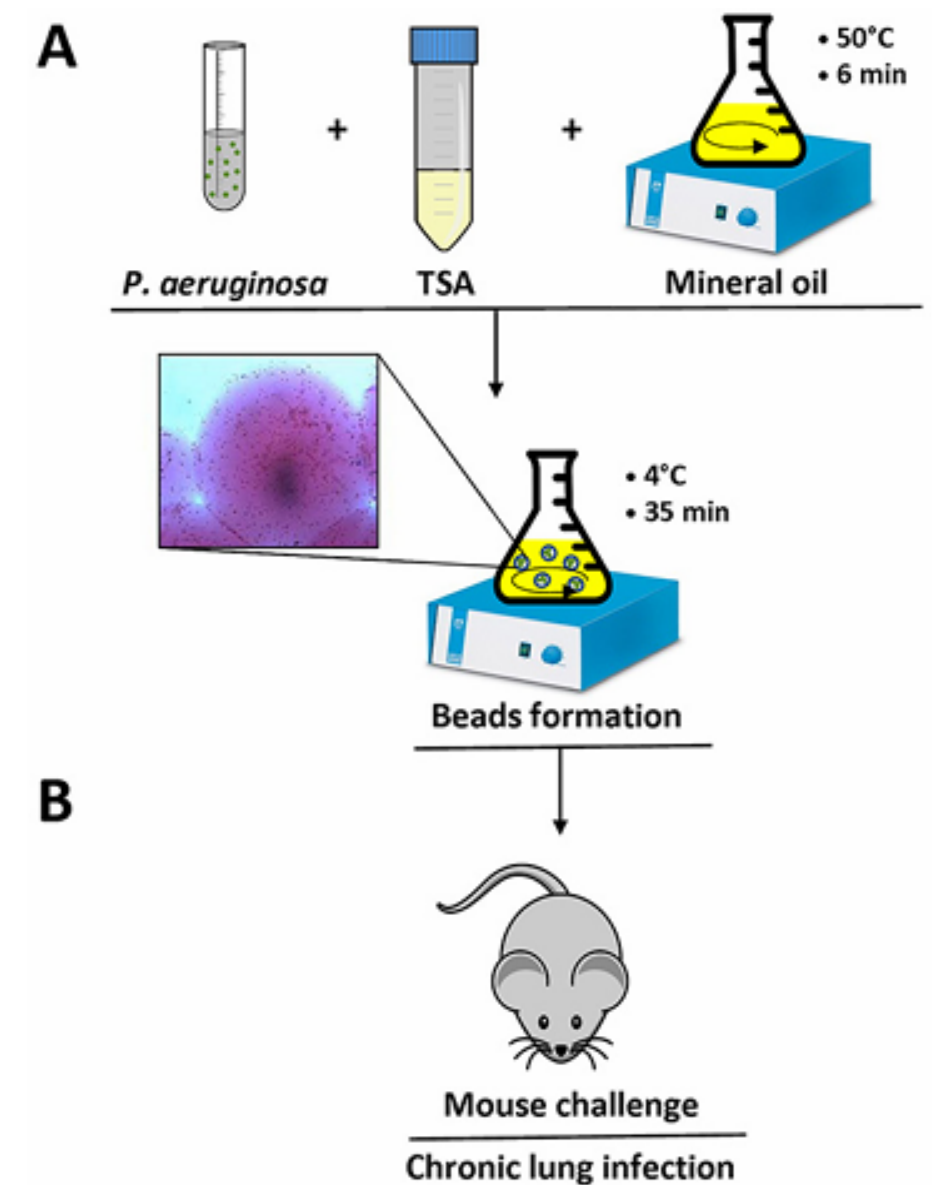
Tecnica delle AGAR BEADS

Procedura complessa, richiede precisione

1	Crescita dei batteri
2	Rinfresco della coltura
3	Formazione delle beads
4	Lavaggio e quantificazione
5	Inoculo nel modello animale

- La coltura batterica viene mescolata con **terreno liquido (TSA) contenente 1,5% di agar** mantenuto a 50°C e **olio minerale** preriscaldato a 50°C, e **agitata energicamente per circa 6 minuti a temperatura ambiente** → si forma un'emulsione.

- Successivamente il sistema viene **raffreddato lentamente a 4°C con agitazione lenta per circa 35 minuti** → l'agar solidifica formando **MICROSFERE** che intrappolano i batteri.



Tecnica delle AGAR BEADS

Procedura complessa, richiede precisione

1	Crescita dei batteri
2	Rinfresco della coltura
3	Formazione delle beads
4	Lavaggio e quantificazione
5	Inoculo nel modello animale

Le beads vengono a questo punto recuperate tramite **centrifugazione**, **lavate** accuratamente per rimuovere l'olio minerale che potrebbe interferire con le analisi successive. Successivamente **si conta il numero di batteri inclusi**, con l'obiettivo di ottenere una **dose standard di circa 10^6 batteri per inoculo**.

- Pochi batteri porterebbero ad un'infezione non stabile
- Troppi batteri porterebbero al rischio di distress respiratorio e mortalità dell'animale.

Le agar beads vengono **conservate a 4°C overnight** e **successivamente risospese** prima dell'utilizzo, poiché tendono a sedimentare.

Le beads vengono quindi **INIETTATE NELLA TRACHEA DEL TOPO** in un volume di circa 50 µL.

- Prima della procedura, l'animale viene **anestetizzato**.
- Successivamente viene **monitorato** fino al completo risveglio e poi riportato nella gabbia.

FASE ANALITICA POST-INFEZIONE: EUTANASIA

1- EUTANASIA



Indotta tramite overdose di analgesico

2- BAL



Lavaggio broncopolmonare e raccolta del liquido per le analisi successive

3- SEPARAZIONE DEI LOBI



Esportazione dei polmoni e divisione in lobi dell'organo

4- OMOGENIZZAZIONE TESSUTALE



Omogenizzazione del tessuto tramite centrifugazione

5- CONTO DELLE CFU



CFU nel BAL + CFU dell'omogenato polmonare

6- VALUTAZIONE DELLE CITOCINE



Inserire nel liquido per il BAL gli inibitori delle proteasi

7- CYTOSPIN



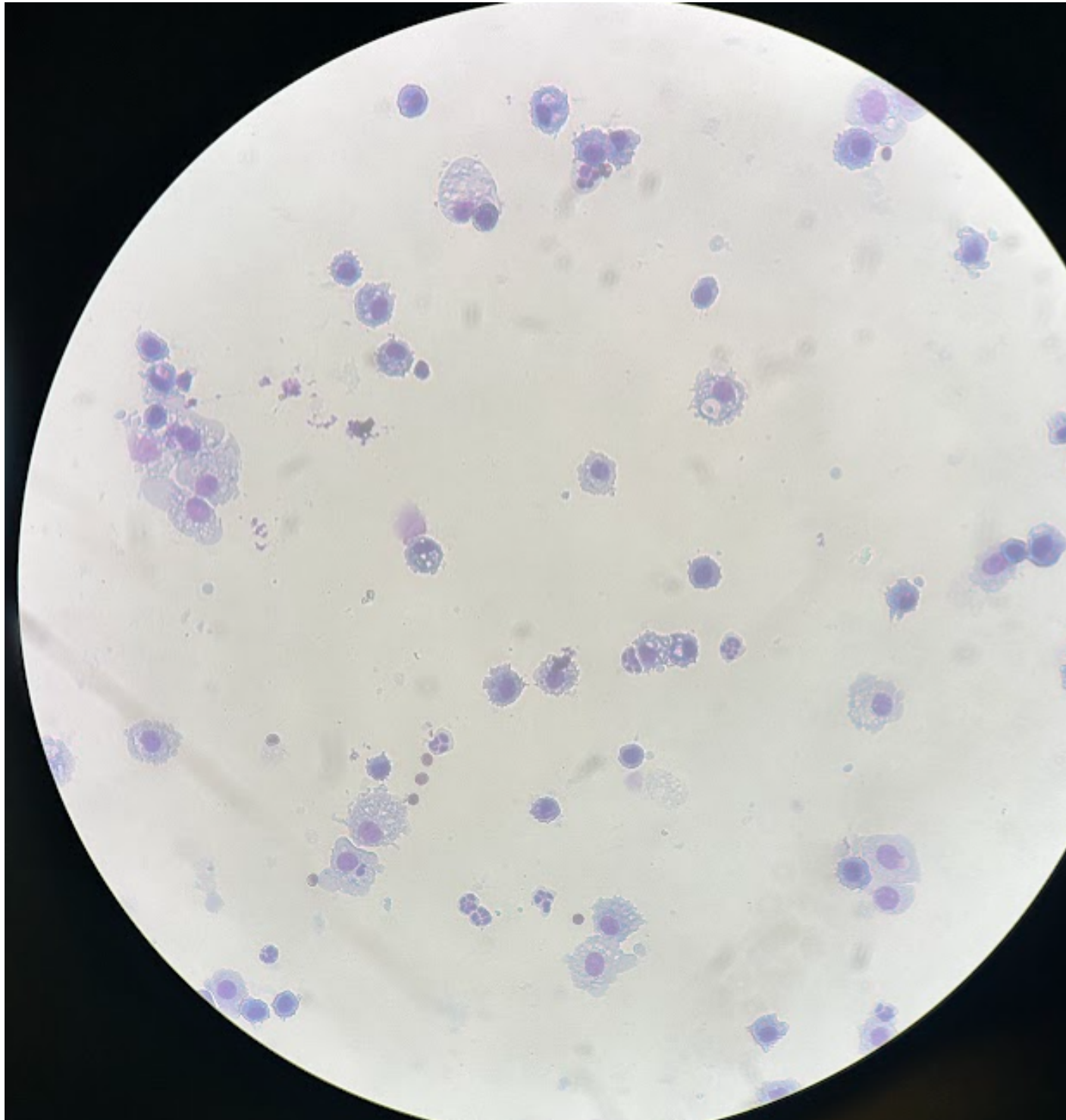
Utile per concentrare le cellule da analizzare sui vetrini

8- COLORAZIONE ED ESAME ISTOLOGICO



I polmoni non omogenati e non trattati con BAL vengono sottoposti ad analisi istologiche

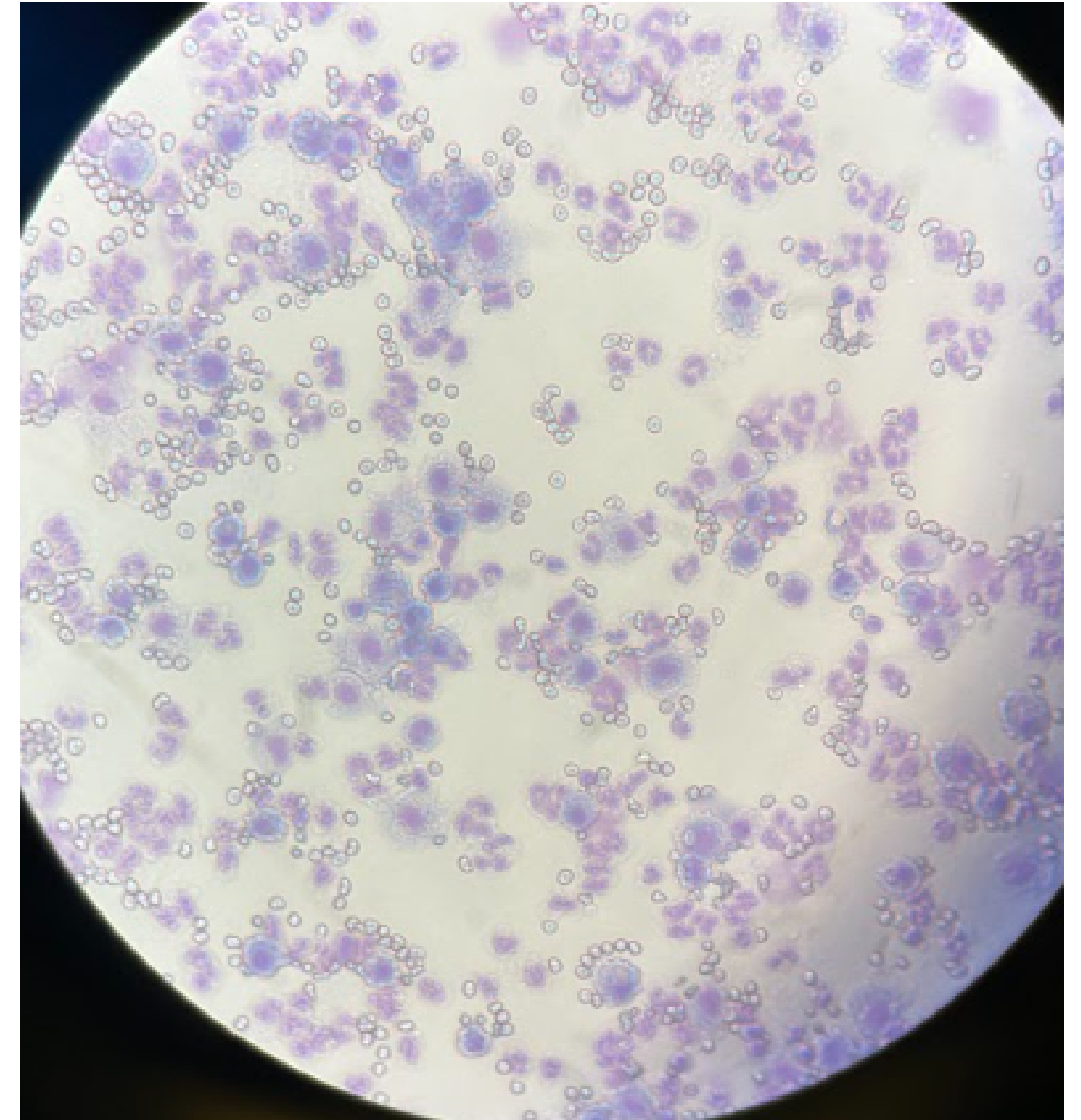
VETRINO DI CONTROLLO



Minor numero di macrofagi
Quasi assenti i neutrofili
Molto rari gli eritrociti



VETRINO INFETTO



Maggior numero di macrofagi
differenziati
Elevati livelli di neutrofili ed eritrociti

QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE NEL BAL E ANALISI ISTOLOGICHE DEI POLMONI

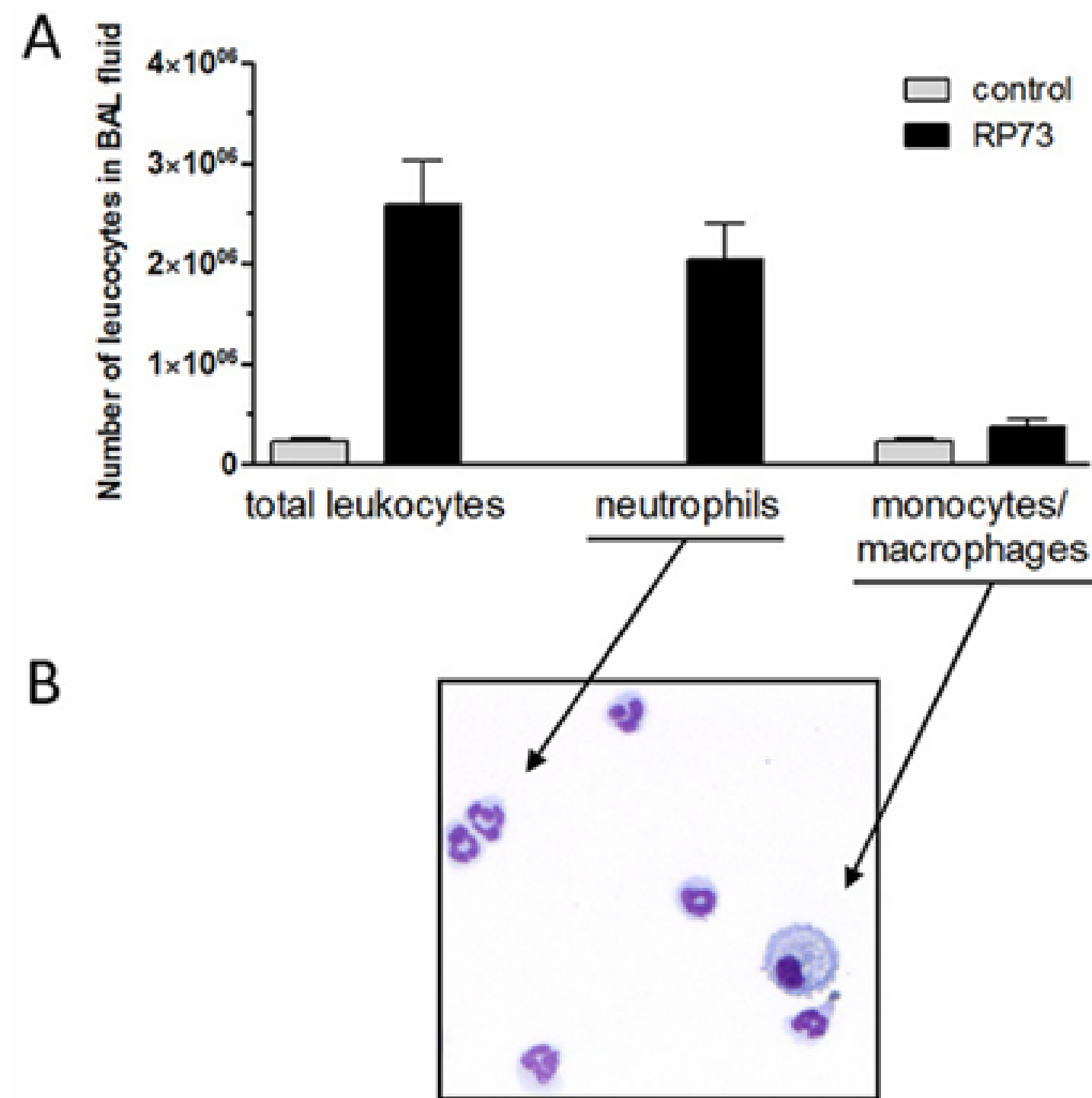


Figure 3. Evaluation of inflammation in BAL fluid after 7 days of chronic infection with RP73 clinical strain. (A) The graph shows the content of total leukocytes, neutrophils and monocytes/macrophages recovered in the BAL fluid of RP73 chronically infected mice after 7 days from challenge compared to uninfected mice (control). Mean values and SEM are represented. (B) In the box below arrows indicate neutrophils and a macrophage as seen in a spot on a slide after cyospin. [Click here to view larger image.](#)

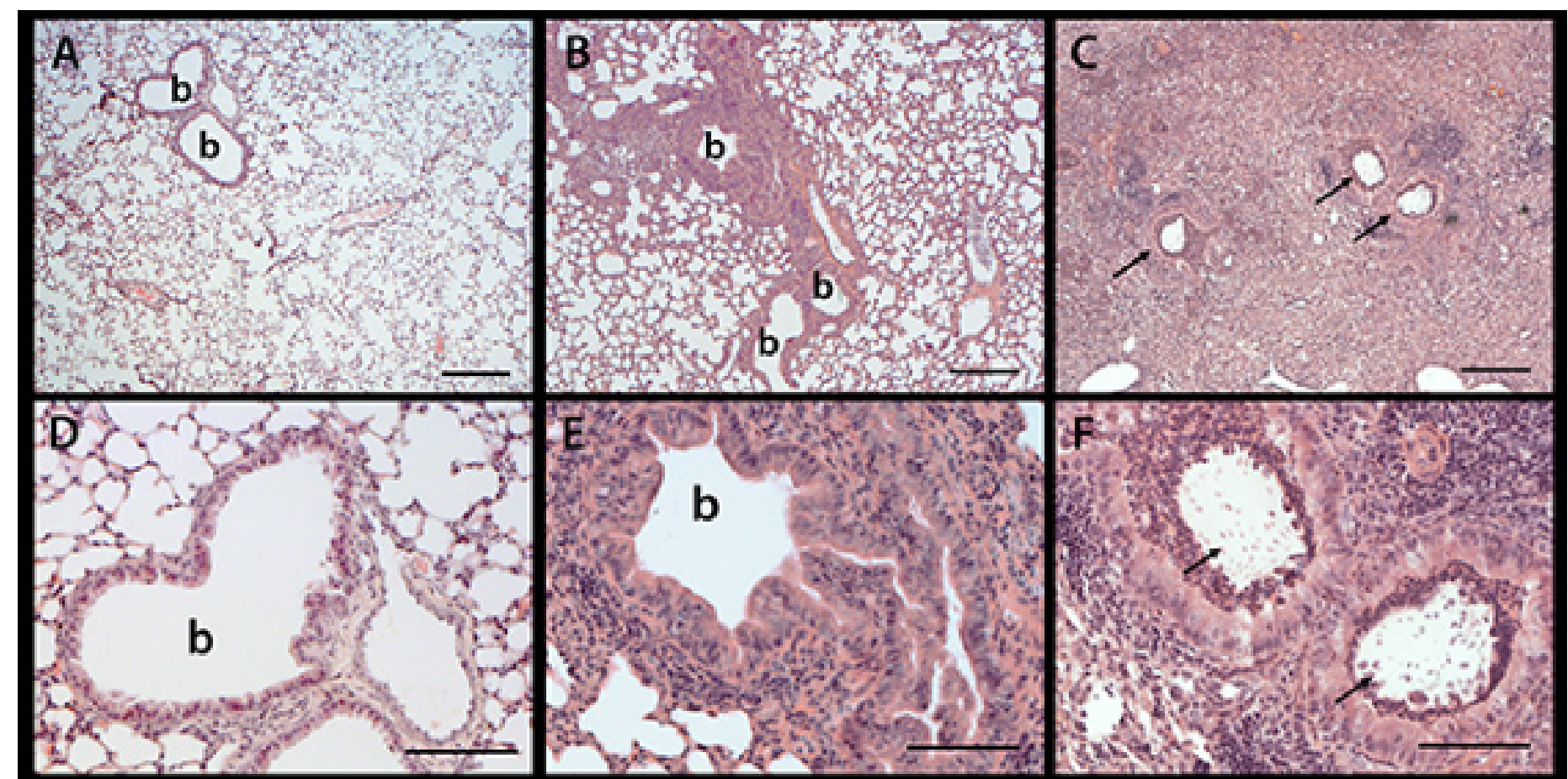
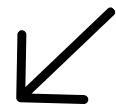


Figure 4. Hematoxylin and eosin staining on histological sections of lungs after 7 days of chronic infection with RP73 clinical strain. The panel shows hematoxylin and eosin staining of lung sections of uninfected mice (A and D) and of mice challenged with agar-beads containing RP73 (B, C, E, F). The infection is pluri-focal and generally involves one or more lung lobes (C and F), whereas the others are unaffected or marginally involved (B and E). Arrows indicate agar beads deposited in the bronchial lumen (b). Lines (A, B, C) 250 μ m; lines (D, E, F) 100 μ m. [Click here to view larger image.](#)

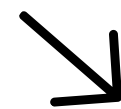
MODULATORI CFTR: COSA SAPPIAMO E COSA MANCA

Qual è stato l'impatto dei nuovi farmaci modulatori?

I farmaci modulatori costituiscono un'ECCEZIONE



Solo MTD
determinata *in vivo*



Efficacia valutata solo in
cellule primarie umane

Perché?

- Divergenza molecolare
- Discrepanze anatomiche

Evidenze *real life*

Effetti tossici sistemici non predetti:

- Rash cutanei
- Danno epatico
- Effetti neuropsichiatrici: ansia, depressione, istinti suicidi

Protocolli di estensione dell'utilizzo:

Pazienti portatori di mutazioni genetiche che *in vitro* non mostravano alcuna responsività al farmaco hanno manifestato un beneficio clinico reale.

NEUROTOSSICITÀ E PROSPETTIVE FUTURE

Ipotesi iniziale: All'inizio della commercializzazione, il Trikafta era indicato per pazienti dai 12 anni in su. La comparsa di manifestazioni ansiose era stata interpretata dagli psicologi come una reazione adattiva. Avendo vissuto fino a quel momento senza la possibilità di concepire un futuro a lungo termine (mancanza del concetto di pianificazione vitale), l'improvviso miglioramento clinico aveva indotto nei pazienti una crisi esistenziale legata alla necessità di dover improvvisamente progettare una vita adulta.

Evidenza successiva: L'abbassamento dell'età di somministrazione ai pazienti di 6 anni ha confutato tale ipotesi. Anche nei bambini, soggetti biologicamente privi della struttura cognitiva deputata alla pianificazione della vita adulta, si sono registrati i medesimi disturbi neuropsichiatrici. Tale evidenza ha dimostrato che l'eziologia del disturbo non è puramente psicologica, bensì biologica e neuropsicologica, legata all'azione diretta della molecola sul SNC.

Situazione attuale:

- I pazienti CF, pur assumendo farmaci modulatori, hanno comunque un rischio aumentato di infezione polmonare.
- Infezione cronica → difficile da eradicare
- In corso studi per comprendere il meccanismo neurotossico

Strategia: Introduzione del **Vanzacaftor** in sostituzione dell'Elexacaftor.

Perché? Penetrazione minore a livello della BEE

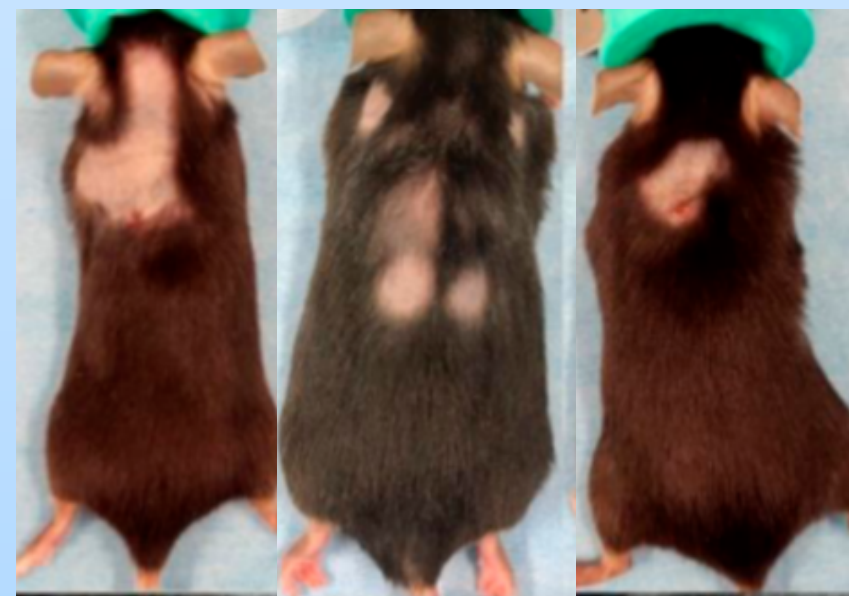
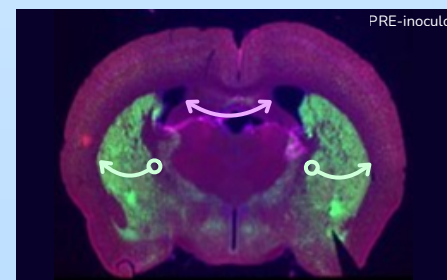
CONCLUSIONI E DUBBI

Il modello murino è affidabile, ma emergono punti critici utili a comprendere meglio la risposta all'infezione

COME IDENTIFICARE EVENTI AVVERSI DISEASE-UNRELATED?

Esclusi grazie a selezione genomica
preliminare: ceppi batterici stabili (no sepsi)
e linee murine controllate (no mutazioni)

unici effetti osservati:
macrocefalia (inoculo troppo precoce)
alopecia (stress sistemico)



NUOVI TRIAL CLINICI SU MODELLI PIU' ADEGUATI?

richiedono grandi spazi
difficile mantenere
condizioni sterili/SPF

dati poco affidabili



CONCLUSIONI E DUBBI

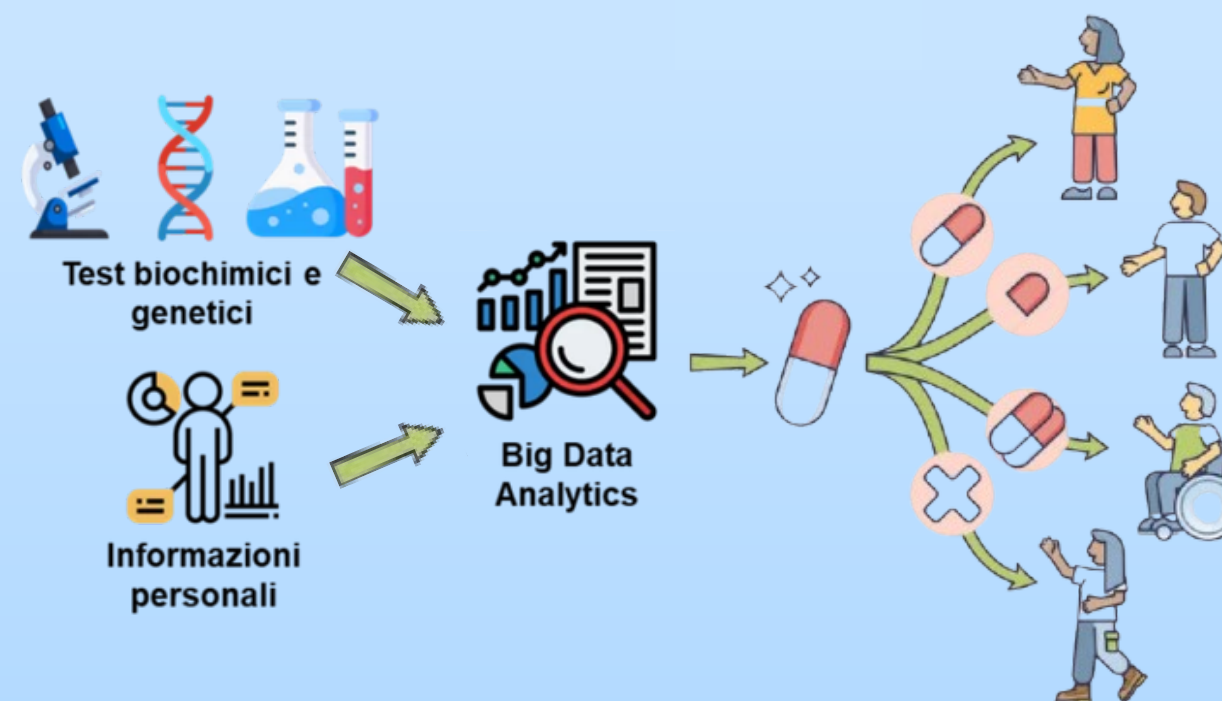
I BATTERI NELLE BEADS POSSONO DIFFONDERE?

No, grazie a studi genomici per la selezione
dei ceppi batterici e valutate tutte le
possibili mutazioni

ESISTONO DIFFERENZE TRA MASCHI E FEMMINE?

ormoni e immunità influenzano
infezione e risposta ai modulatori

obiettivo: definire dosi più accurate
e linee guida personalizzate



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

