

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 2

SVILUPPO DI UN PROGETTO DI RICERCA SPERIMENTALE

- 1) Stato dell'arte
- 2) **Domande aperte**
- 3) Ipotesi
- 4) Obiettivi
- 5) Approccio sperimentale
- 6) Risultati attesi
- 7) Rischi e possibili soluzioni

STUDIO delle basi molecolari della COVID-19



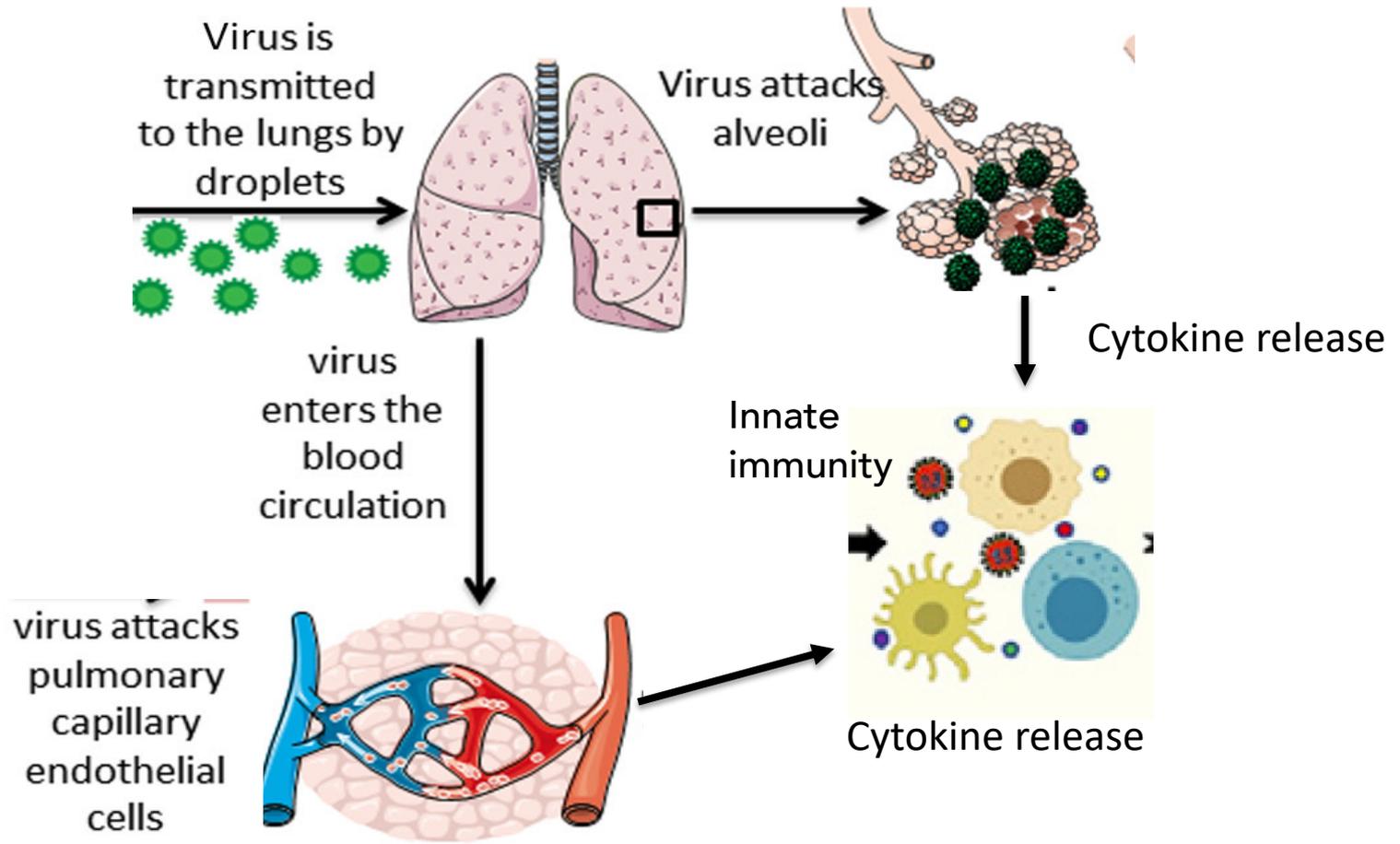
Domande scientifiche

Perchè alcuni pazienti sviluppano una **patologia lieve** mentre altri più **severa**?

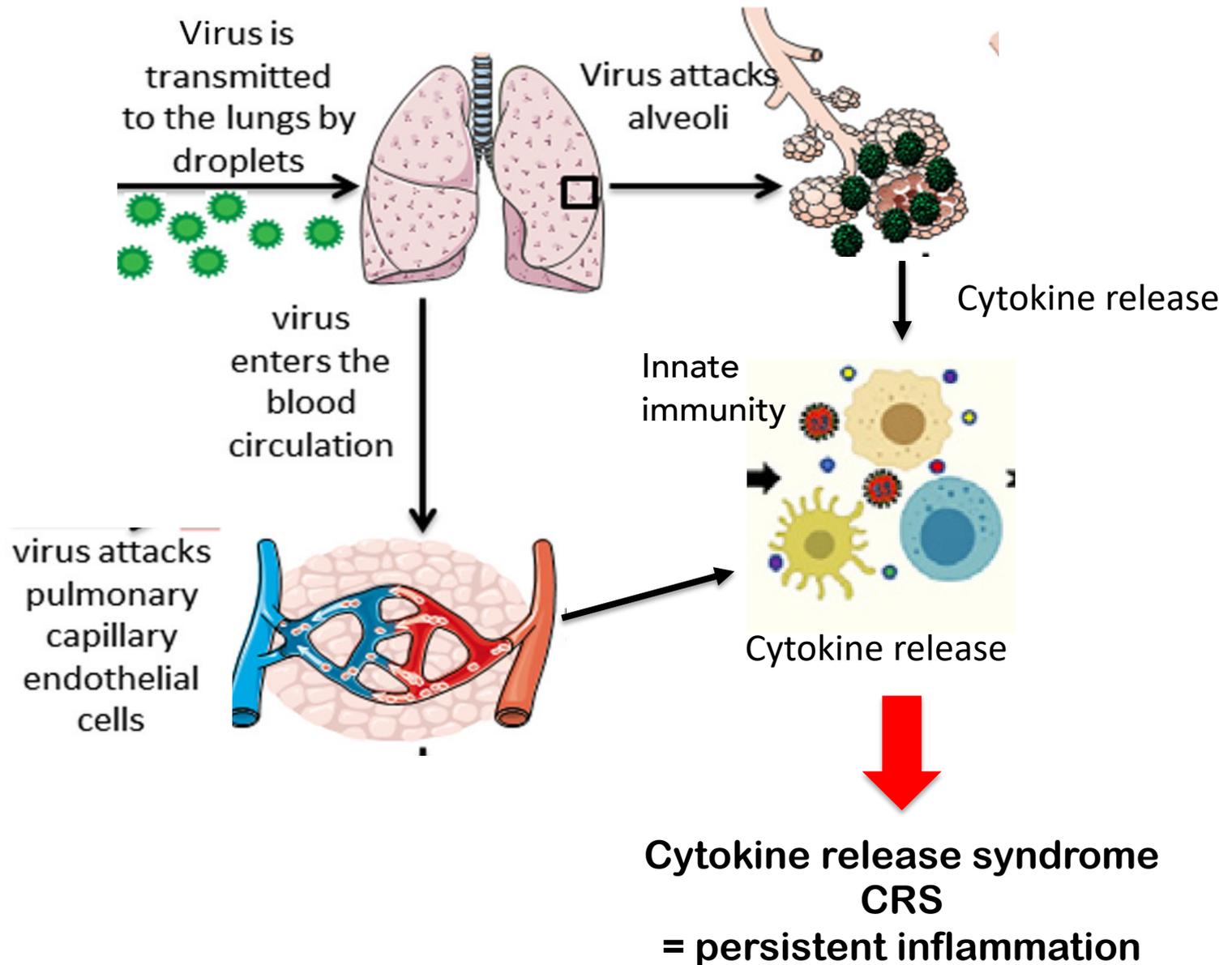
Quali sono le basi molecolari della long COVID?

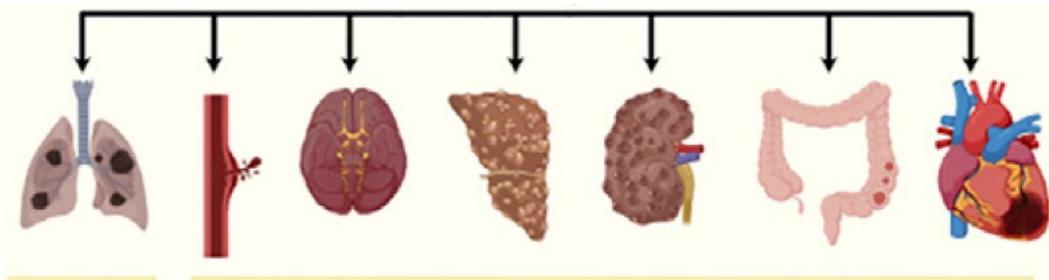
Perchè la patologia severa/long COVID interessa **tessuti diversi** da quelli infettati dal virus?

STATO DELL'ARTE & DOMANDE



STATO DELL'ARTE & DOMANDE





Systemic symptoms



Long COVID symptoms

fever, fatigue, pain
immunothrombosis, ischemia
neuroinflammation- brain fog...

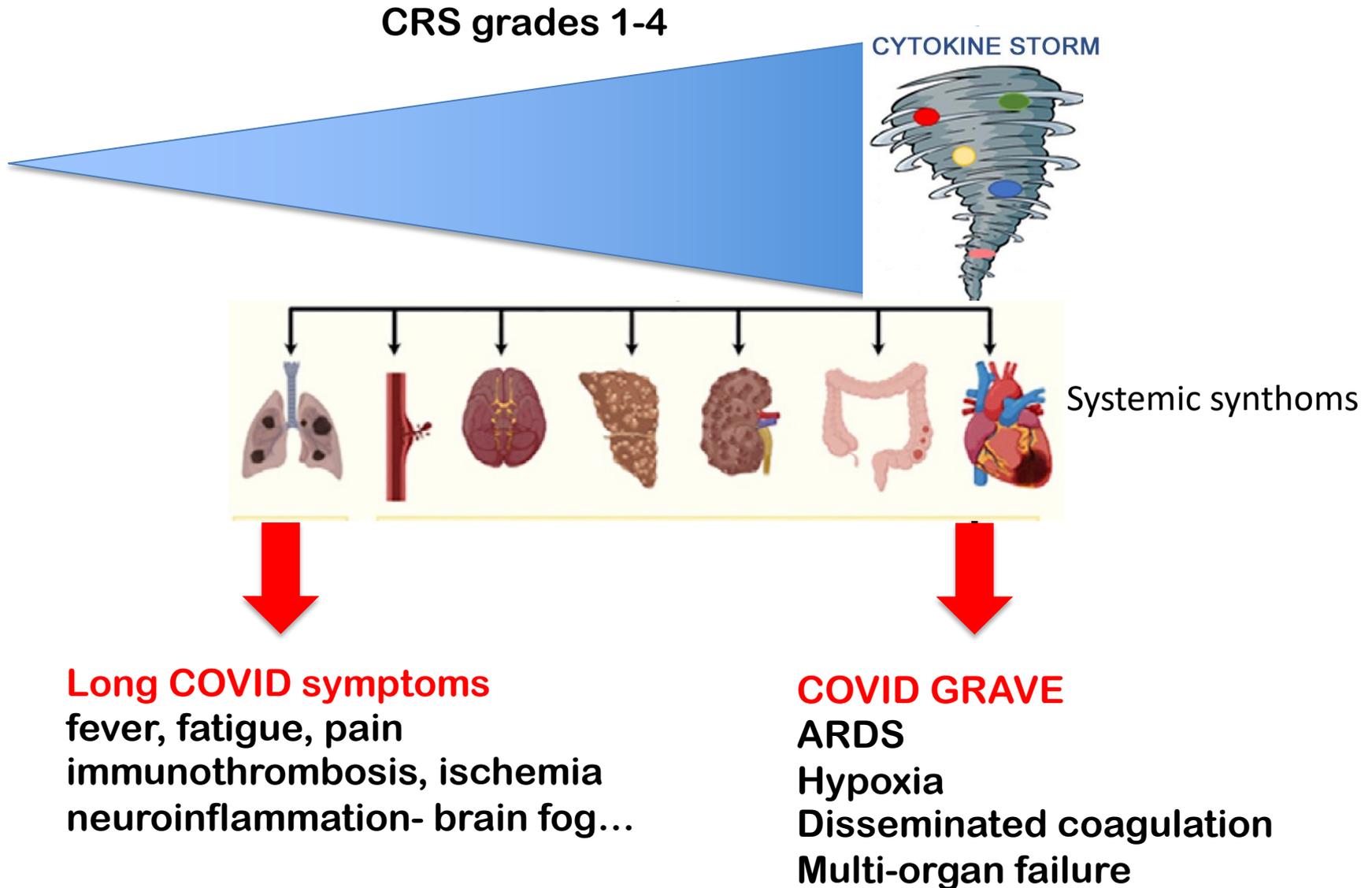
COVID GRAVE

ARDS
Hypoxia
Disseminated coagulation
Multi-organ failure

Domande scientifiche

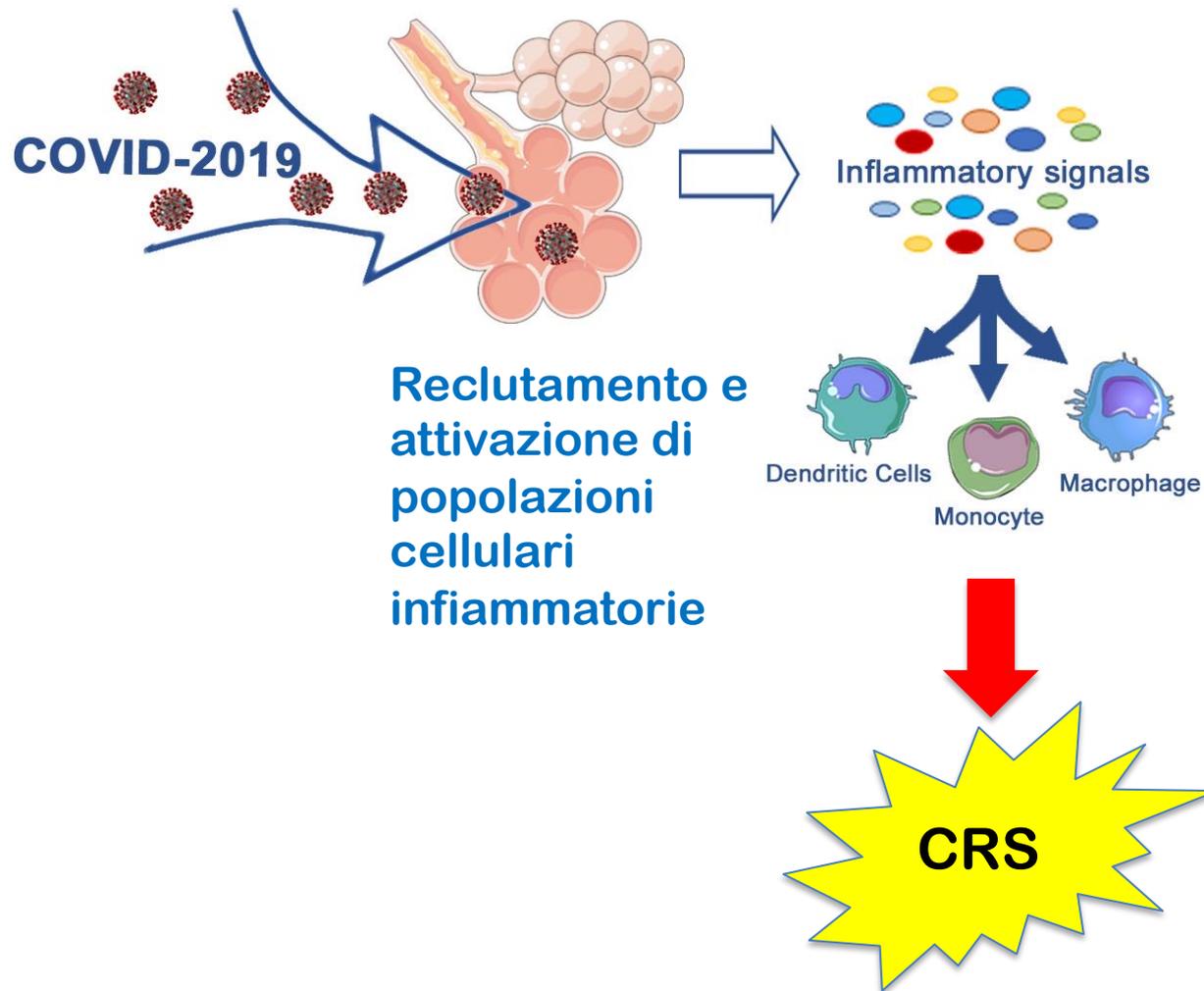
Qual è il ruolo della **risposta infiammatoria dell'ospite** (scatenata dall'infezione virale) nella patogenesi della COVID grave?

STATO DELL'ARTE & DOMANDE



IPOSTESI

L'interazione tra specifici **fattori virali e cellulari** scatena nell'ospite una **risposta infiammatoria anomala**, responsabile della patologia COVID severa/ long COVID.



OBIETTIVI

1. Identificare i **fattori** (virali e cellulari) e i **meccanismi** implicati nell'induzione dell'infiammazione;
2. Comprendere se tali meccanismi possano causare **danni a tessuti** non infettati dal virus
3. Comprendere se i fattori identificati possano rappresentare markers **prognostici**
4. Identificare **bersagli terapeutici** “trattabili” per le forme severe e/o croniche della patologia.

APPROCCIO SPERIMENTALE

1. Scegliere un **approccio che analizza le interazioni** di proteine cellulari con i fattori virali per identificare i fattori responsabili dell'innesco dell' infiammazione.
2. Selezionare **un candidato**, quindi studiare gli effetti sulla **risposta infiammatoria** (in vitro) e sulla **tossicità** cellulare.
3. **Inibire specificamente** i meccanismi identificati e analizzare le conseguenze sui processi infiammatori e sulla tossicità cellulare.

RICADUTE - APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE

SVILUPPO/RIPOSIZIONAMENTO DI FARMACI per la terapia della Covid-19

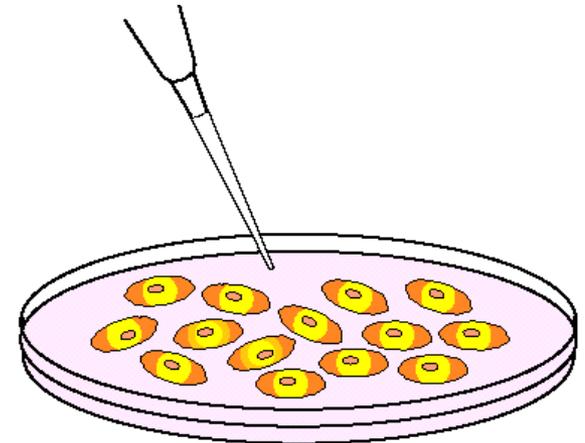
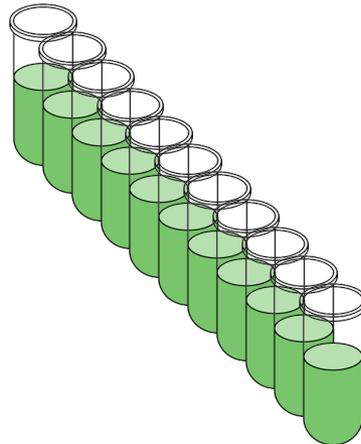
Molecola o
processo bersaglio



Design razionale
o
Drug Screening

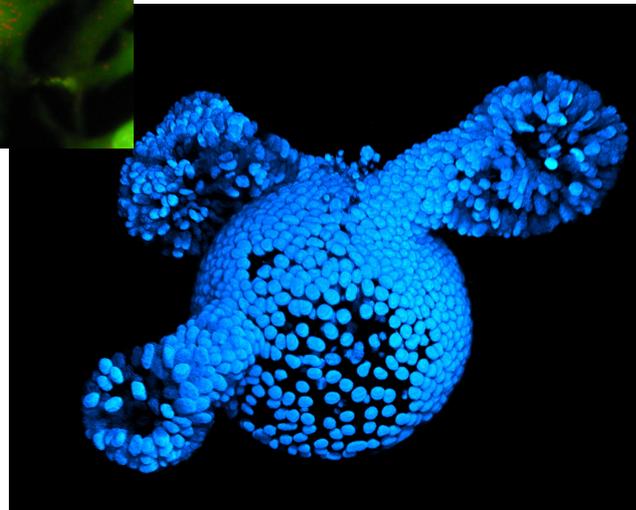
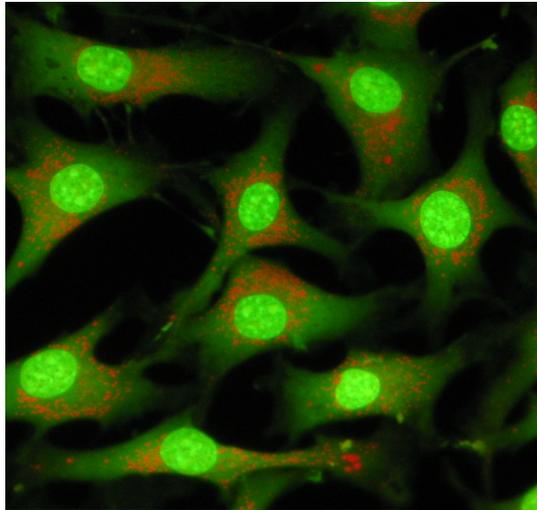


Test che valutano
gli effetti su
specifici
processi biologici



APPROCCIO SPERIMENTALE

Questo approccio sperimentale è realizzabile utilizzando le bioTECNOLOGIE CELLULARI

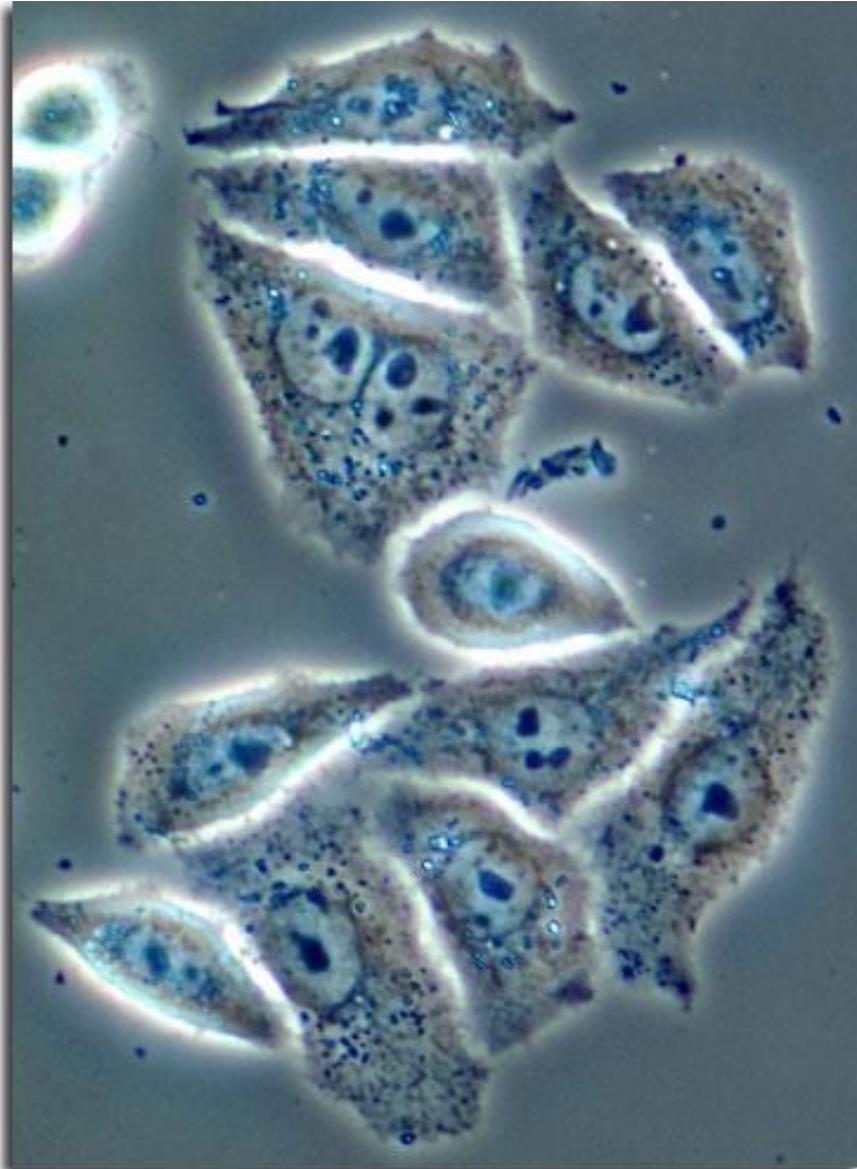


APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

1. SCELTA DEL **MODELLO CELLULARE**
2. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
3. SCELTA DEI SAGGI
4. SCELTA DEGLI STRUMENTI

SCelta DEL MODELLO

CELLULARE



Biochemical tools

Complexity of culture

Model system
in life sciences



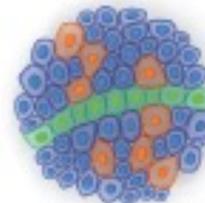
Monolayer cell culture



Spheroid



Organoid



Tissue explant



Multiplexed models
"on-a-chip"

Organization of
the body



Subcellular



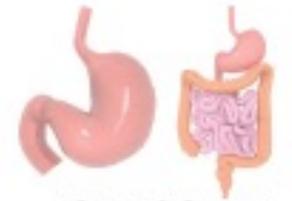
Cells



Simple tissue



Layered tissue



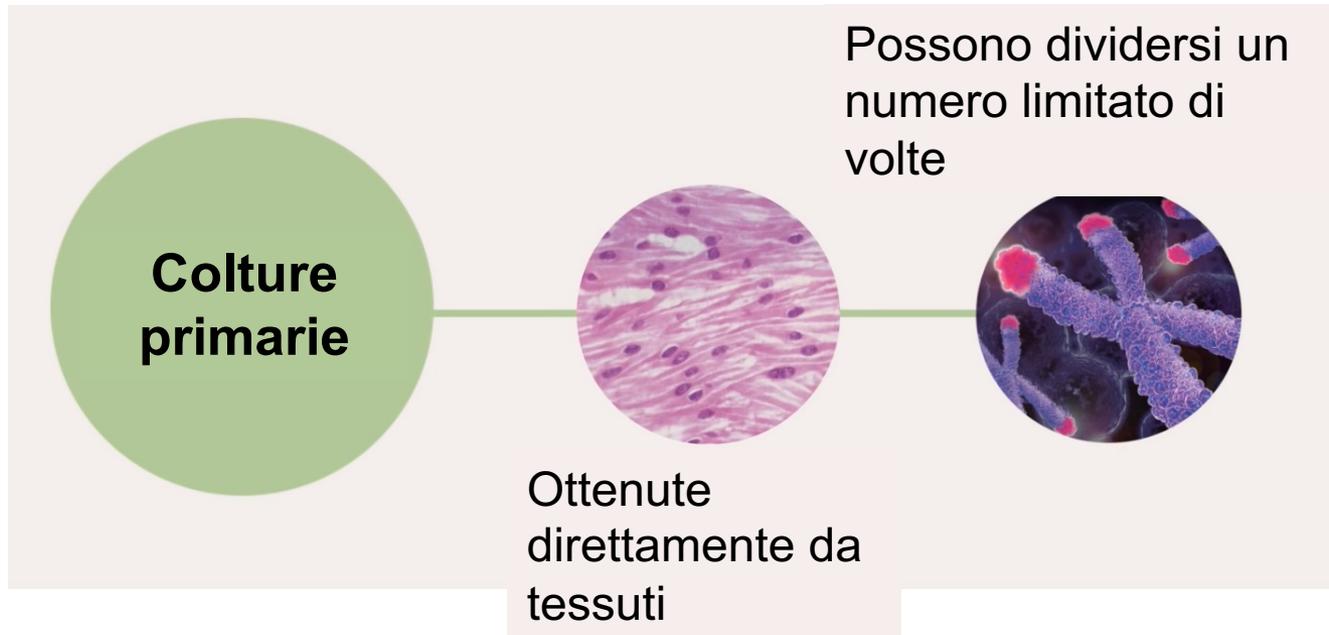
Organ & System



Body

Scale

Colture cellulari primarie



LE COLTURE CELLULARI PRIMARIE

Una coltura cellulare PRIMARIA è costituita da cellule che derivano direttamente da un tessuto, senza essere modificate geneticamente, ed ha una durata limitata.

Dopo la semina, le cellule proliferano (se al terreno è stato aggiunto siero) fino ad occupare tutta la superficie del recipiente (raggiungono la CONFLUENZA).

A questo punto smettono di dividersi: questo fenomeno è detto INIBIZIONE DA CONTATTO. Se vengono diluite (PASSAGGIO IN COLTURA) in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare: in questo modo la coltura viene PROPAGATA.

Tuttavia, la CAPACITA' REPLICATIVA di queste cellule (cioè il numero massimo di divisioni che possono compiere) è LIMITATA.

Generazione di una coltura primaria da tessuto

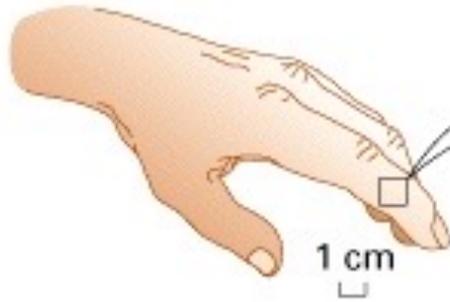
Per allestire colture cellulari in vitro (o di organoidi) si deve partire da un espianto di **tessuto** (una biopsia), e se questo è solido le cellule devono essere **dissociate, cioè isolate le une dalle altre e dalla matrice extracellulare.**

Nei tessuti solidi di tipo **epiteliale** (es. epidermide, colon, polmone, ghiandola mammaria etc.) le cellule sono strettamente **adese** le une alle altre

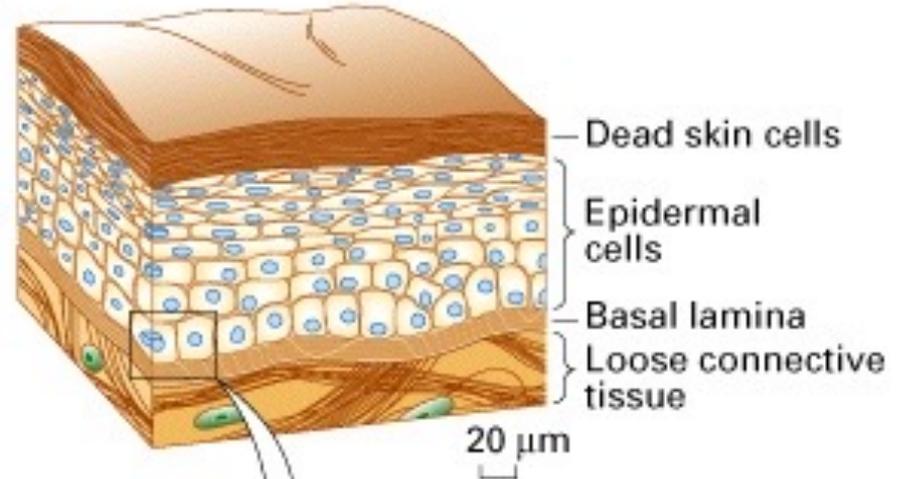
mentre nei tessuti di tipo **mesenchimale** (es. tessuto connettivo, tessuto adiposo, etc.) le cellule sono separate, però sono circondate da abbondante **matrice extracellulare**, che deve essere eliminata prima di porre le cellule in coltura.

ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

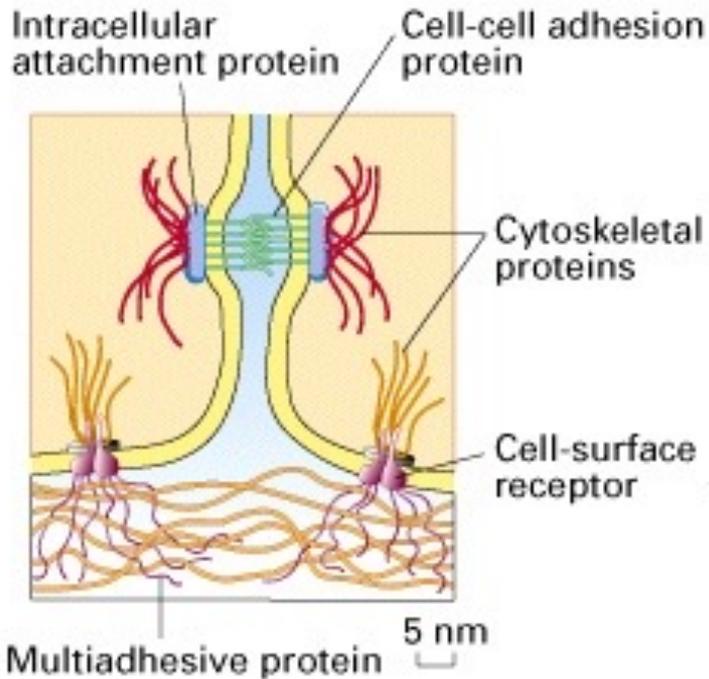
(a)



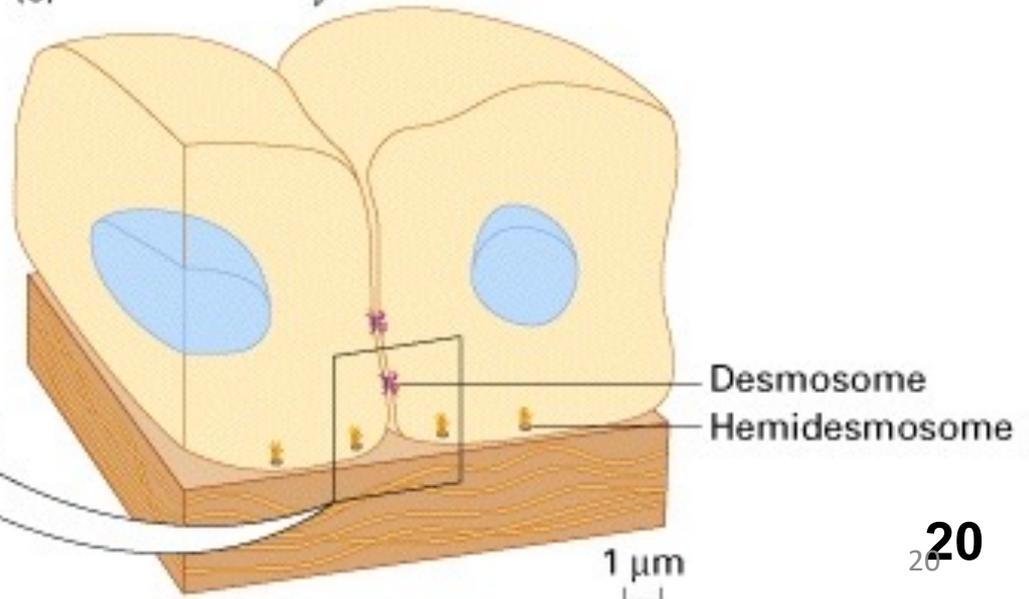
(b)



(d)



(c)



Il tessuto deve essere perciò dapprima **sminuzzato** e **omogeneizzato** in condizioni di sterilità. Ciò si ottiene tagliuzzando finemente il tessuto con un bisturi; se il tessuto è abbastanza molle e si può disporre di quantità abbastanza abbondante del materiale di partenza, è possibile l'uso di omogenizzatori elettrici. Non ci si deve preoccupare di rompere le cellule, poichè con questi trattamenti si ottengono frammenti di tessuto.

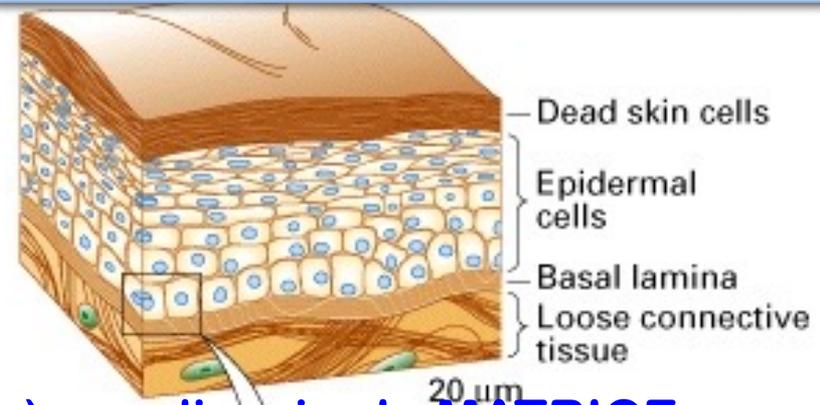
In seguito l'omogeneizzato viene sottoposto a dei trattamenti chimici ed enzimatici, che possono essere effettuati anche utilizzando uno strumento da banco detto dissociatore (slide 7).

Per **eliminare la matrice** che circonda le cellule si usano **enzimi proteolitici**, in grado di digerire il collagene e le altre proteine, ed in aggiunta **enzimi glicolitici** che digeriscono i polimeri dell'acido ialuronico e altri glucosaminoglicani.

Molti tessuti, ad esempio quelli epiteliali, sono composti da cellule strettamente adese le une alle altre grazie alla presenza di giunzioni intercellulari. Queste vanno dissociate sia mediante l'uso di proteasi che eliminano le proteine di membrana responsabili dell'adesione cellula-cellula sia utilizzando agenti chimici chelanti dei cationi bivalenti (come Ca^{++} e Mg^{++} i quali stabilizzano le giunzioni) quali l'EDTA o l'EGTA.

ALLESTIMENTO di una coltura cellulare:

DISSOCIAZIONE
di singole **CELLULE**
da un espianto di **TESSUTO**



TECNICHE (usate in combinazione) per digerire la **MATRICE**
extracellulare e dissociare le **GIUNZIONI** intercellulari

Trattamento **meccanico**

bisturi, omogenizzatore

Seguito da (anche nel dissociatore)

Trattamento con **enzimi**

proteolitici (tripsina, collagenasi, elastasi)

glicolitici (ialuronidasi)

Trattamento con **agenti chimici** (EDTA, EGTA)

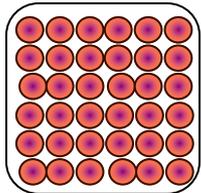
chelanti dei cationi bivalenti (Ca^{2+}) che stabilizzano le giunzioni
cellulari

DISSOCIATORE cellulare da banco

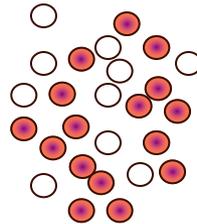


ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D

da un tessuto



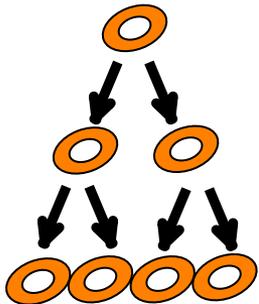
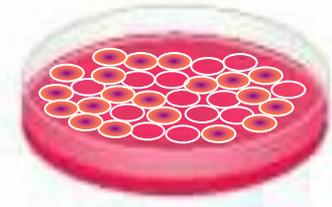
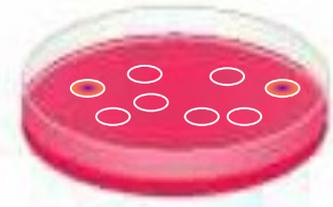
si dissociano singole cellule



Se non viene aggiunto **SIERO**,
le cellule non proliferano:

QUIESCENZA

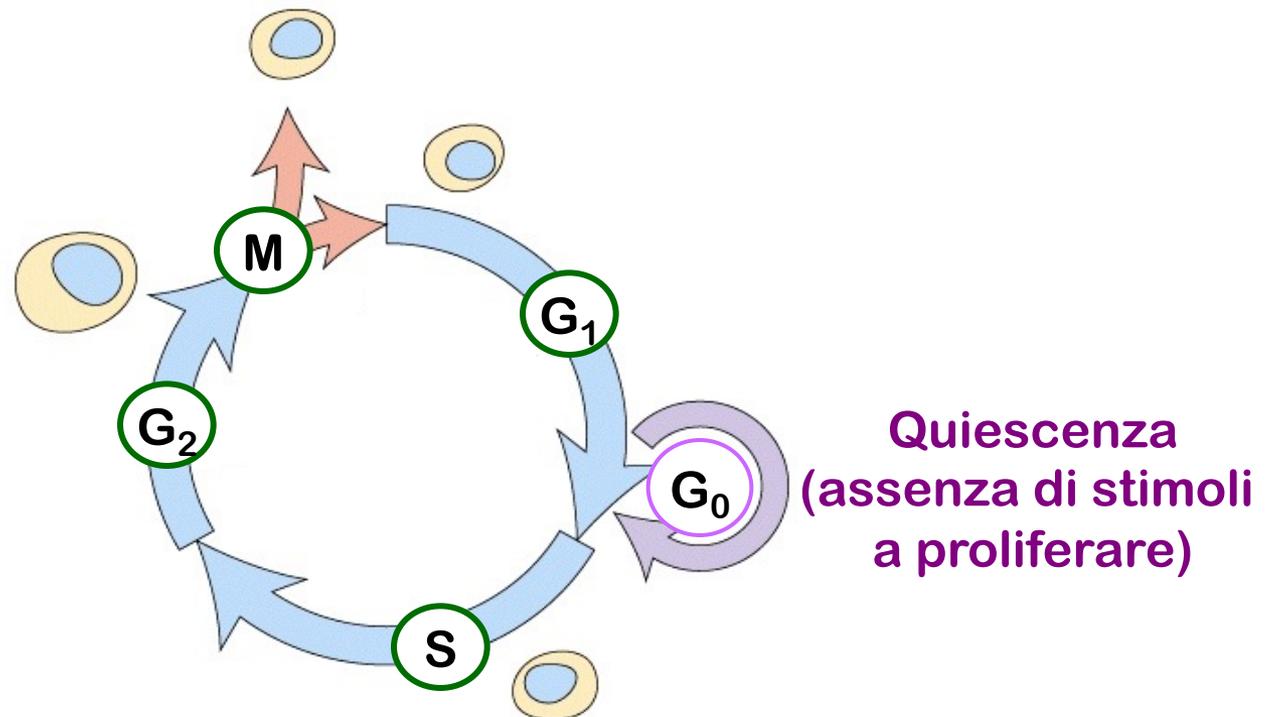
e si seminano in terreno:



Se **stimolate** con siero, le cellule
proliferano finchè occupano tutta la
superficie del recipiente
(**CONFLUENZA**)

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (1): QUIESCENZA

In assenza di fattori di crescita = deprivazione da siero
le cellule non proliferano



Le cellule quiescenti sono **arrestate reversibilmente** alla fase **G0** del ciclo cellulare

Rientrano in ciclo dopo stimolazione con fattori mitogeni (= siero)

FATTORI DI CRESCITA

Per proliferare le cellule necessitano di stimolazione da parte di **fattori di crescita**. In assenza di questi le cellule NON proliferano.

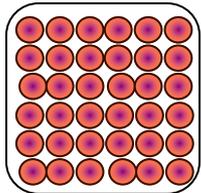
Solitamente non si aggiungono al terreno fattori purificati, ma si usa comunemente il **siero fetale bovino (FCS)**.

Se il terreno **NON** contiene **FCS: basale o di mantenimento**

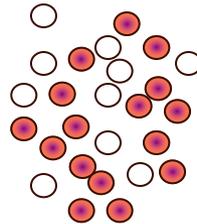
Se il terreno **contiene FCS: completo o di crescita**

ALLESTIMENTO DI UNA CULTURA CELLULARE 2D

da un tessuto



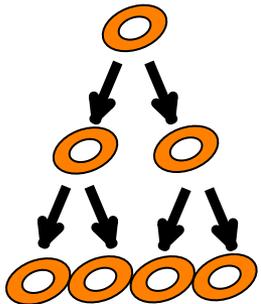
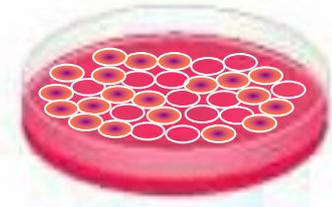
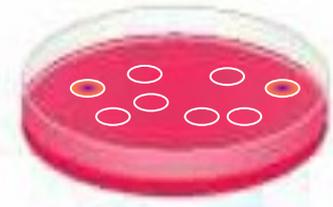
si dissociano singole cellule



Se non viene aggiunto **SIERO**,
le cellule non proliferano:

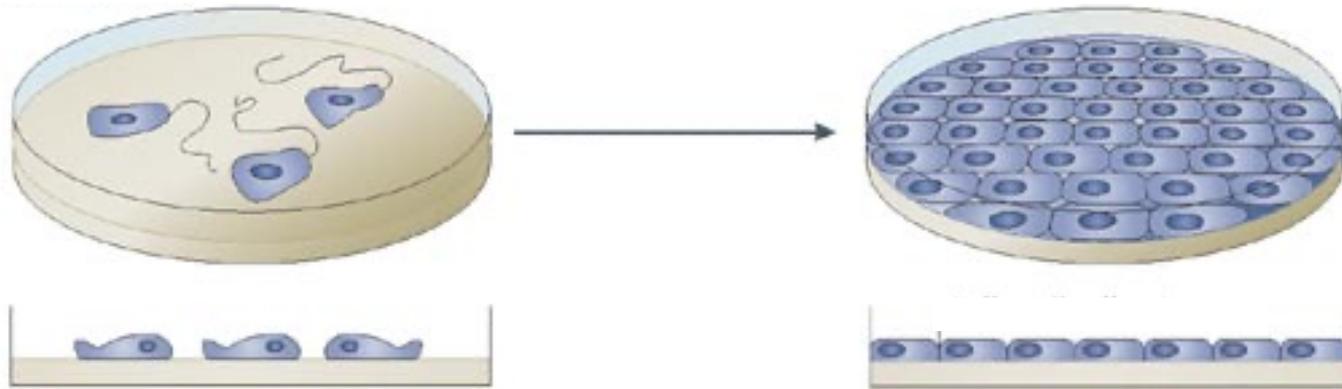
QUIESCENZA

e si seminano in terreno:



Se **stimolate** con siero, le cellule
proliferano finchè occupano tutta la
superficie del recipiente
(**CONFLUENZA**) poi SMETTONO DI
PROLIFERARE: **QUIESCENZA**

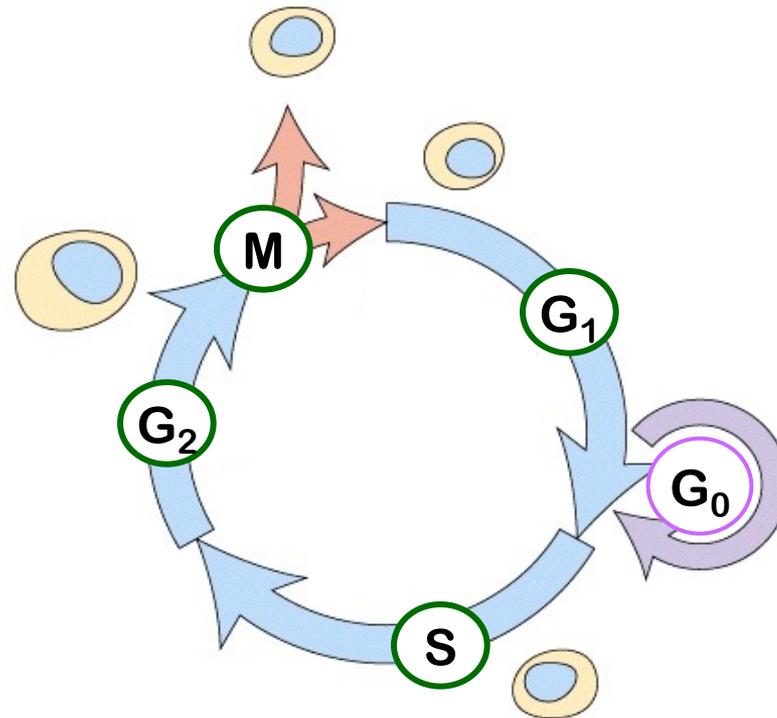
Le cellule proliferano fino ad occupare tutta la superficie del recipiente = raggiungono la **CONFLUENZA**



Quindi smettono di proliferare = **INIBIZIONE DA CONTATTO**.

Se però vengono diluite (**PASSAGGIO IN COLTURA**)
in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare.

ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA (2): INIBIZIONE DA CONTATTO



Quiescenza =
Segnali citostatici es.
inibizione da contatto

Le cellule che subiscono **l'inibizione da contatto** sono arrestate **reversibilmente** alla **fase G₀** del ciclo cellulare (= **quiescenza**)
Rientrano in ciclo dopo diluizione.

L'arresto del ciclo cellulare può avvenire in risposta a diversi stimoli e di conseguenza le cellule arrestate possono subire destini diversi. Possono uscire dal ciclo di divisione in maniera transitoria o comunque reversibile, oppure arrestare il ciclo cellulare in maniera permanente ed irreversibile. Questi fenomeni che si osservano in vitro, cioè in coltura, rispecchiano ciò che avviene in vivo, cioè nell'organismo di origine.

Quando ad esempio mancano gli **stimoli a dividersi**, le cellule entrano in una fase di **quiescenza, detta G₀**, dalla quale possono rientrare nella fase S se opportunamente stimolate con fattori di crescita (il siero in coltura, i fattori secreti da altre cellule in vivo). Una situazione diversa è data **dall'inibizione a dividersi** esercitata dal contatto con altre cellule (**inibizione da contatto**), che avviene anche se lo stimolo da siero è presente. Anche in questo caso le cellule sono arrestate reversibilmente alla fase **G₀** del ciclo cellulare. La rimozione dell'inibizione (ad esempio dopo diluizione mediante **passaggio in coltura**) permette alle cellule di riprendere la proliferazione.

In alcuni casi le cellule smettono di dividersi perché vanno incontro a differenziamento terminale, oppure a causa di danni al DNA. In questo caso vi sarà un arresto (reversibile oppure irreversibile) nel quale il ciclo cellulare si ferma **permanentemente** nella fase G₁ (oppure G₂).

Ad esempio cellule di una coltura primaria possono andare incontro al processo di **senescenza a causa dell'accorciamento dei telomeri (vedi più avanti)**.

ESPERIENZA #1: PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA

SCOPO:

Propagare una coltura di cellule che crescono in adesione effettuando un'operazione di diluizione quando esse hanno raggiunto una elevata confluenza in modo da consentirne la proliferazione e mantenerle in coltura per successivi esperimenti.

Si consiglia la visione dei seguenti video:

Passaggio cellule in coltura

<https://www.youtube.com/watch?v=CMRKKI9XSDU>

Conta cellule all'emocitometro

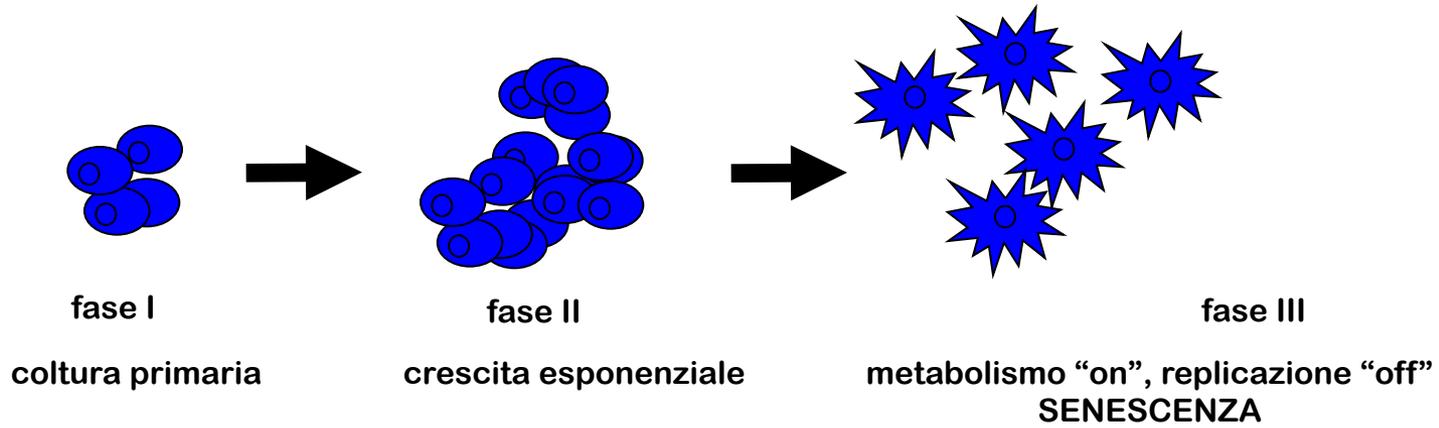
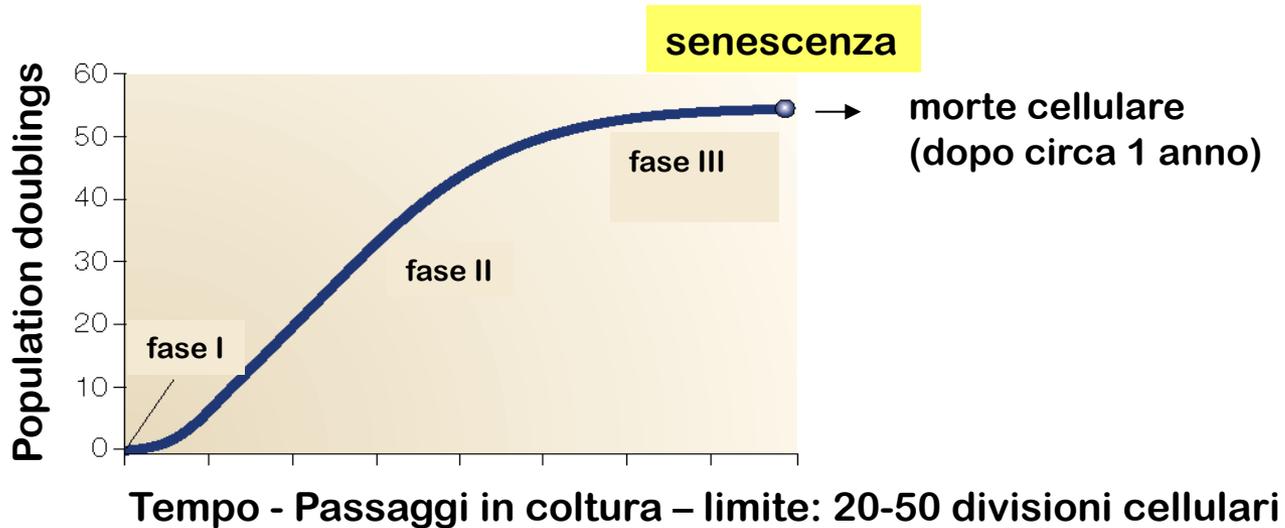
<https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>



Leonard Hayflick, 1960's

Le cellule vanno incontro ad un numero finito di divisioni (20-50 a seconda della specie)

CAPACITÀ REPLICATIVA DI CELLULE UMANE IN COLTURA



Il limite di Hayflick è una funzione del numero di divisioni cellulari

Nel grafico precedente è mostrato l'andamento della capacità proliferativa di una coltura primaria di cellule umane, ad esempio fibroblasti derivati da una biopsia di pelle: **CURVA DI CRESCITA**.

Dopo una fase iniziale di crescita esponenziale le cellule assumono un ritmo di divisione costante formando un ceppo. Dopo un numero **FINITO** di divisioni (e quindi di passaggi in coltura) la coltura entra in una fase di **CRISI**, in cui il numero di cellule non aumenta più a causa della massiccia senescenza (**PARTICOLARE ARRESTO DELLA PROLIFERAZIONE**), il ritmo di proliferazione quindi decresce fino alla morte di tutte le cellule della coltura.

Le cellule somatiche normali hanno MEMORIA

**possono effettuare un numero limitato di passaggi in coltura prima di andare incontro ad ARRESTO PERMANENTE DELLA PROLIFERAZIONE
= SENESCENZA REPLICATIVA**

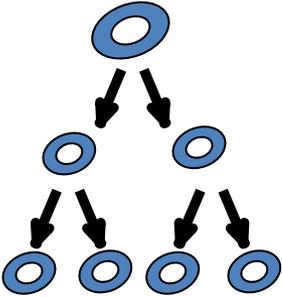
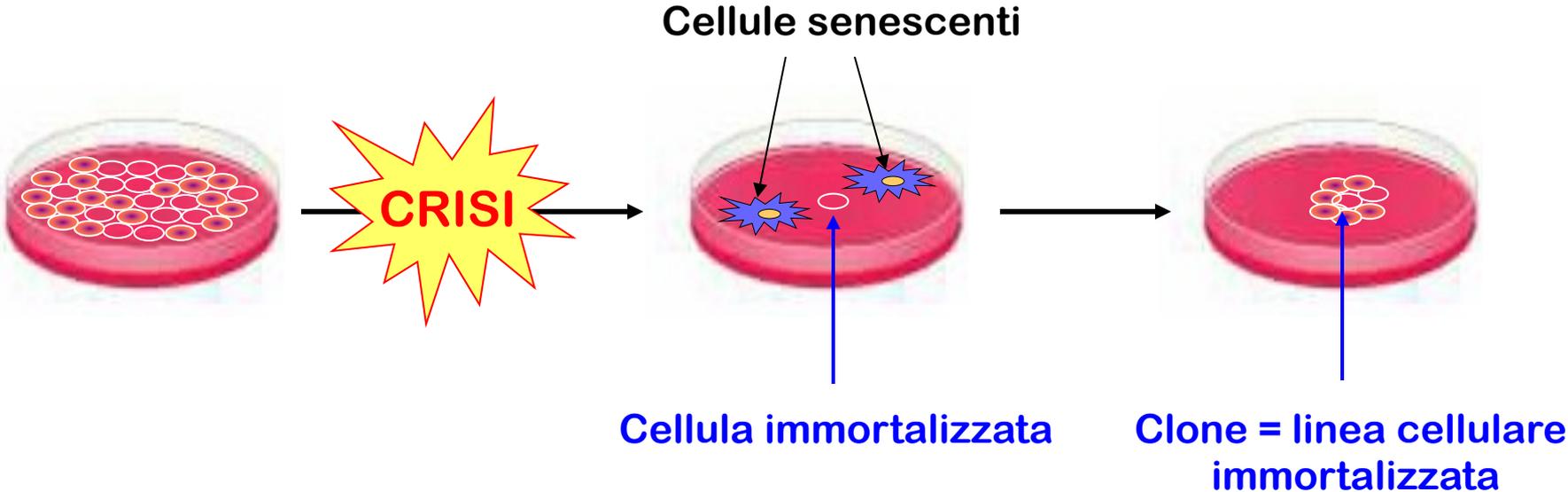
ECCEZIONI :

Linea germinale

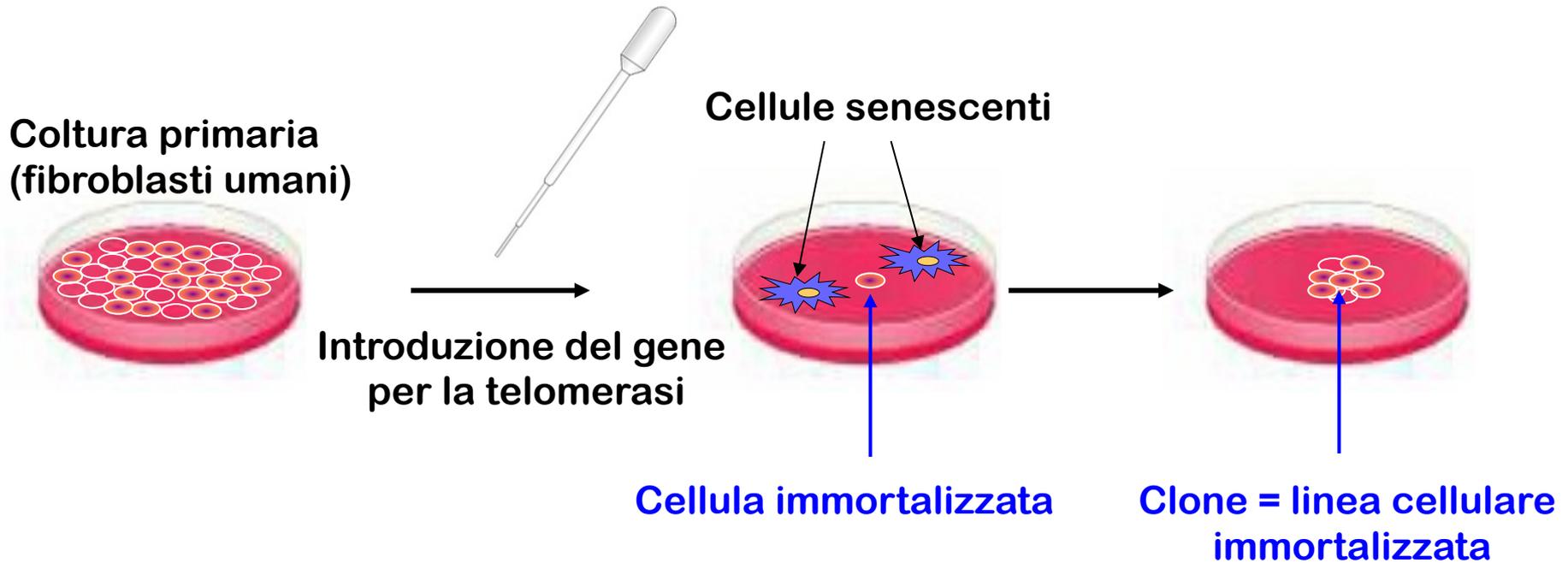
Cellule staminali embrionali

Cellule tumorali

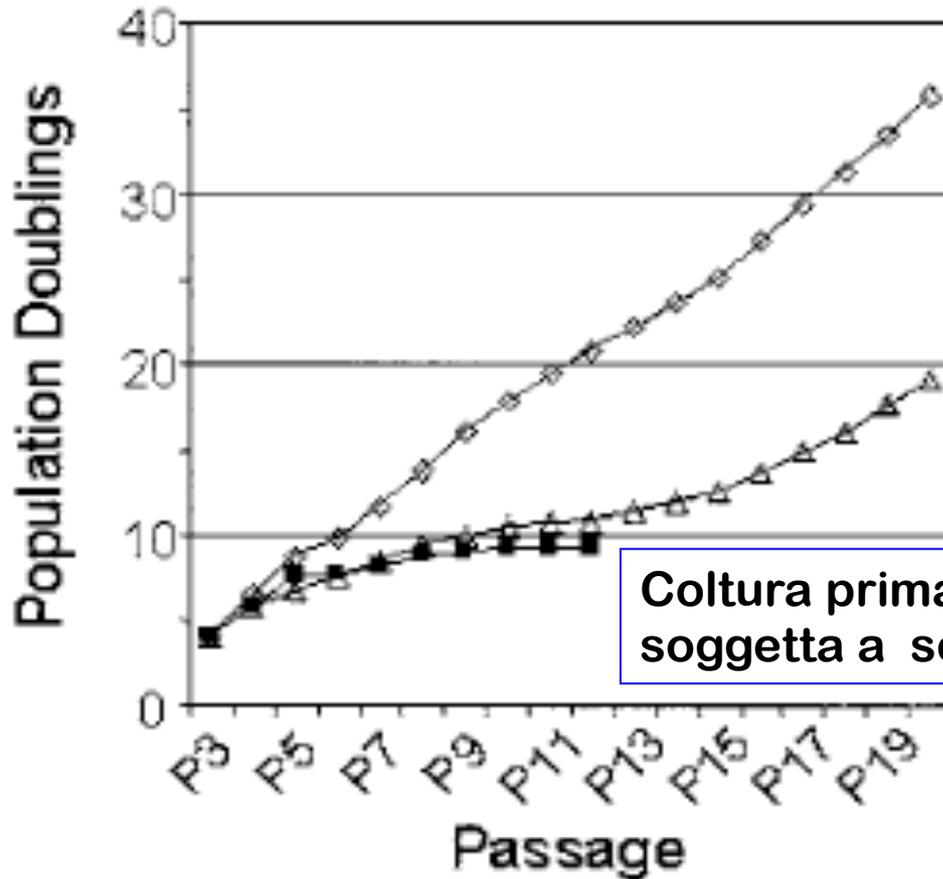
IMMORTALIZZAZIONE SPONTANEA DI CELLULE IN CULTURA



Immortalizzazione di cellule in coltura mediante espressione del gene per la telomerasi (RTase) hTERT



Immortalizzazione di cellule in coltura mediante espressione del gene per la telomerasi (Rtase) hTERT

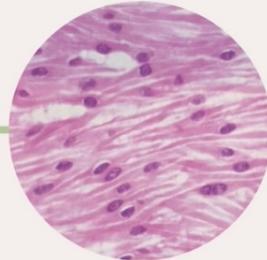


Introduzione di hTERT:
proliferazione
indefinita

Coltura primaria:
soggetta a senescenza

Colture primarie e linee cellulari stabilizzate

Colture primarie

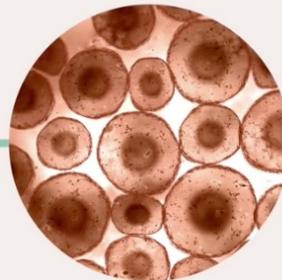


Possono dividersi un numero limitato di volte



Ottenute direttamente da tessuti

Linee cellulari



Utili per la ricerca a lungo termine



Si dividono indefinitamente

IMMORTALIZZAZIONE DI CELLULE IN COLTURA

In coltura (ed anche in vivo) può accadere che alcune cellule SFUGGANO CASUALMENTE AL PROCESSO DI SENESCENZA ed acquisiscano pertanto la CAPACITÀ DI DIVIDERSI INDEFINITAMENTE. La frequenza di tali eventi può essere aumentata mediante irraggiamento o trattamento con agenti mutageni.

Le cellule immortalizzate dividendosi formano dei CLONI cellulari, in cui le cellule figlie sono tutte derivate dalla stessa cellula di partenza.

Il bypass della senescenza all'origine dell'immortalizzazione è dovuto all'insorgenza di MUTAZIONI SPONTANEE in alcuni geni importanti per il processo di senescenza.

Di conseguenza, si può INDURRE l'immortalizzazione alterando selettivamente i geni coinvolti nella senescenza.

Fin dai primi studi sulla senescenza, è stato osservato che la frequenza degli eventi di immortalizzazione spontanea in coltura è specie-dipendente. È infatti un evento estremamente improbabile in cellule normali di derivazione umana, mentre è più frequente in cellule di roditore.

Tali cellule possiedono infatti telomeri molto più lunghi delle cellule umane. Inoltre, la senescenza nei roditori è sottoposta a minori controlli rispetto alle cellule umane: in pratica è sufficiente un singolo evento mutazionale per inattivarla. Questo spiega la frequenza di immortalizzazione in coltura.

Le cellule tumorali sono solitamente immortali, spesso mostrano attività telomerasica, il che suggerisce che potrebbero essere derivate da cellule staminali.

Modelli cellulari in biomedicina

VANTAGGI:

- GRANDE QUANTITA' DI MATERIALE
- ANALISI BIOCHIMICHE
- HIGH THROUGHPUT

LIMITI:

- NON RICAPITOLANO LA COMPLESSITA' TISSUTALE
- CONDIZIONI NON FISILOGICHE (PLASTICA)
- INTERAZIONI CON LA MATRICE LIMITATE

Biochemical tools

Complexity of culture

Model system
in life sciences



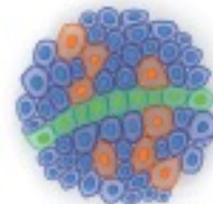
Monolayer cell culture



Spheroid



Organoid



Tissue explant



Multiplexed models
"on-a-chip"

Organization of
the body



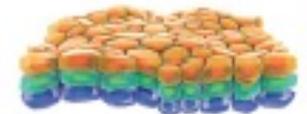
Subcellular



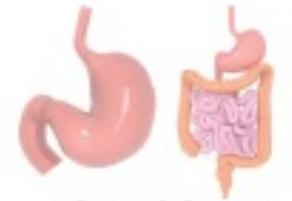
Cells



Simple tissue



Layered tissue



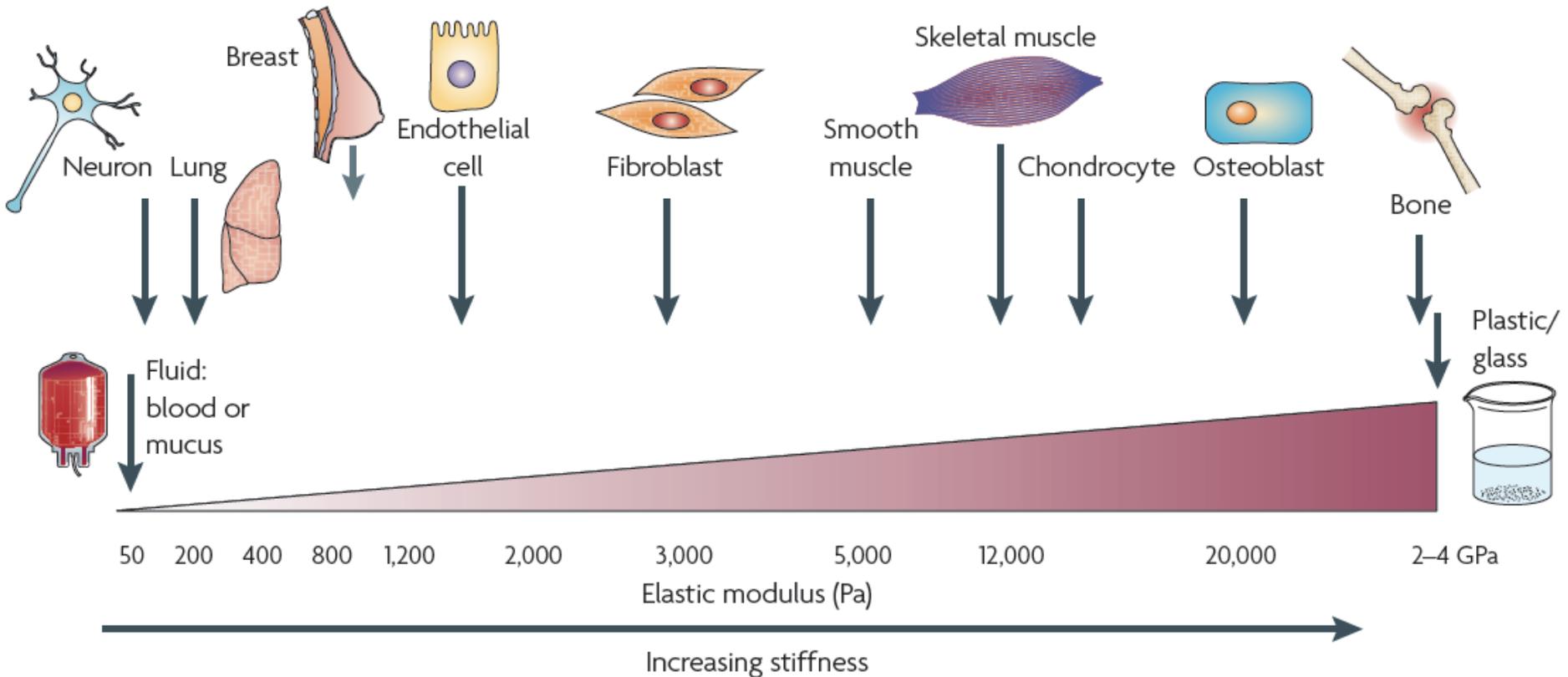
Organ & System



Body

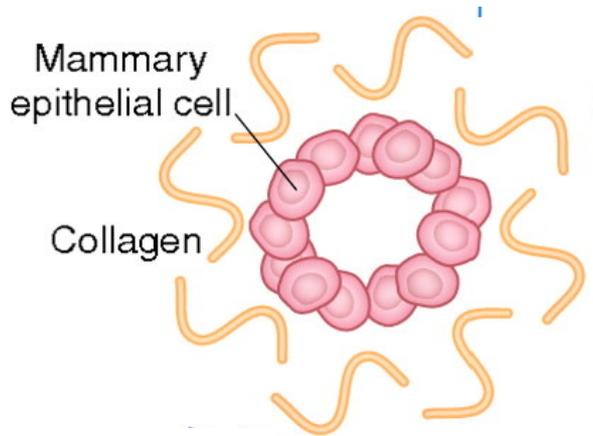
Scale

La plastica è un substrato estremamente rigido = non fisiologico



Le caratteristiche meccaniche del supporto influenzano il comportamento cellulare

Colture cellulari in 3D (sferoidi e organoidi)



Biochemical tools

Complexity of culture

Model system
in life sciences



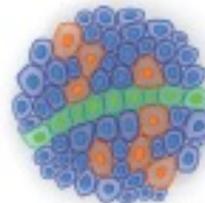
Monolayer cell culture



Spheroid



Organoid



Tissue explant



Multiplexed models
"on-a-chip"

Organization of
the body



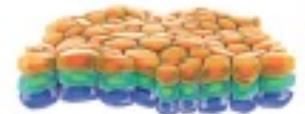
Subcellular



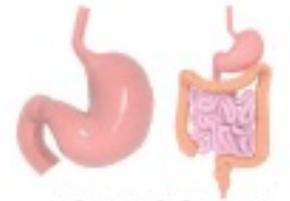
Cells



Simple tissue



Layered tissue



Organ & System



Body

Scale

Colture cellulari in 3D

Colture cellulari 3D possono essere mantenute in vitro in terreno liquido o semisolido (in matrici ricostituite).

Esse mimano/ricapitolano la morfologia, le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice (e quindi il microambiente) del tessuto/organo di origine.

Sono quindi MODELLI FISIOLOGICAMENTE PIU' RILEVANTI rispetto alle colture 2D.

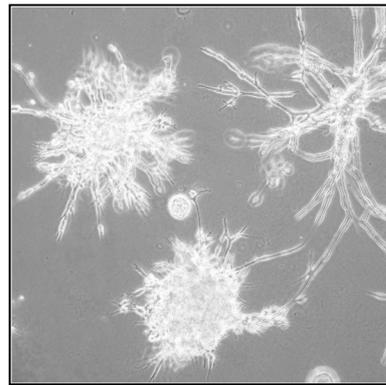
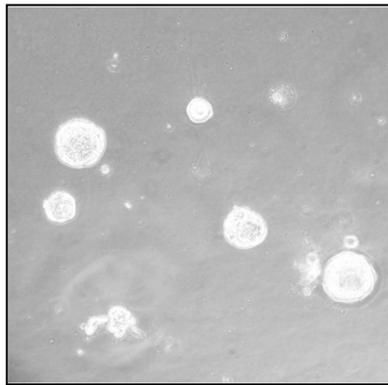
SFEROIDI



Sono **clusters di cellule** che si formano per la tendenza di molti tipi cellulari ad aggregare spontaneamente se coltivati in 3D.

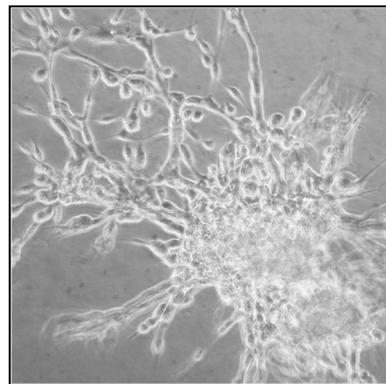
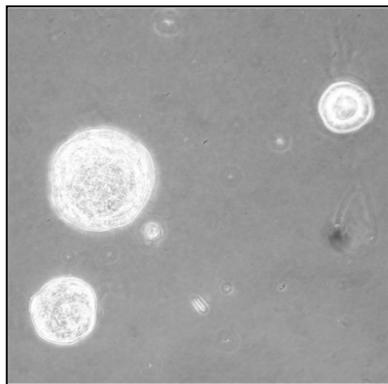
Anche se non ricapitolano l'organizzazione di un tessuto differenziato, possono essere costituiti da popolazioni cellulari eterogenee (parametri spaziali, gradienti biochimici).

Sferoidi normali e tumorali



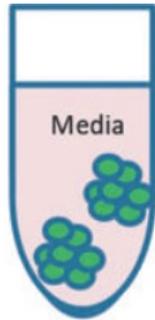
ingrandimento

100x

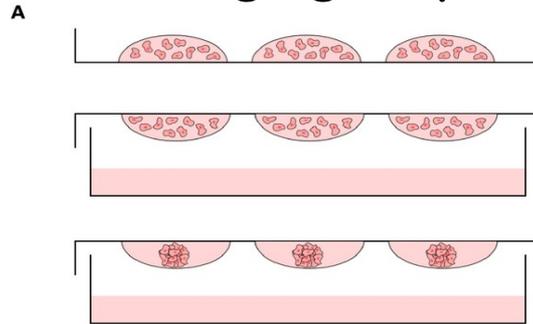


200x

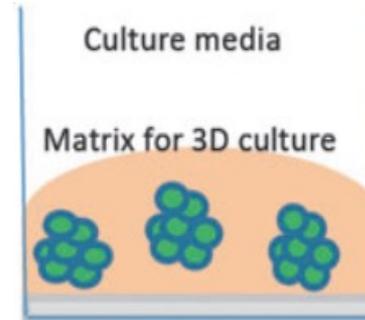
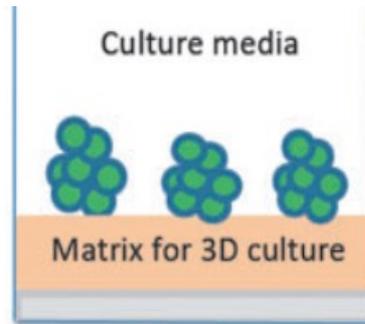
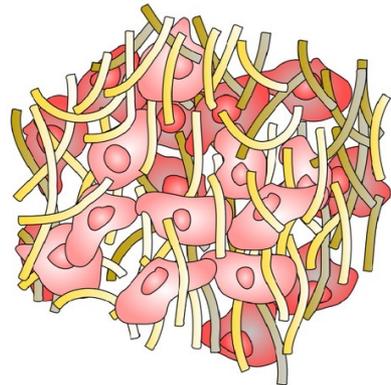
Modalità di coltura 3D



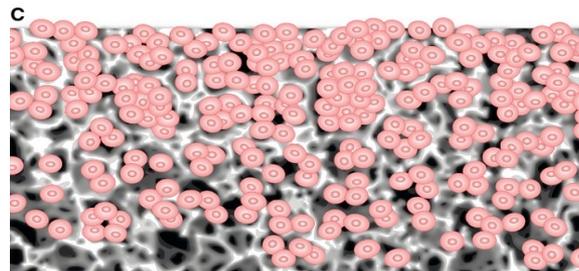
Hanging drop



In terreno liquido



Matrice/
hydrogel



Scaffold poroso

MATRICI per colture 3D:

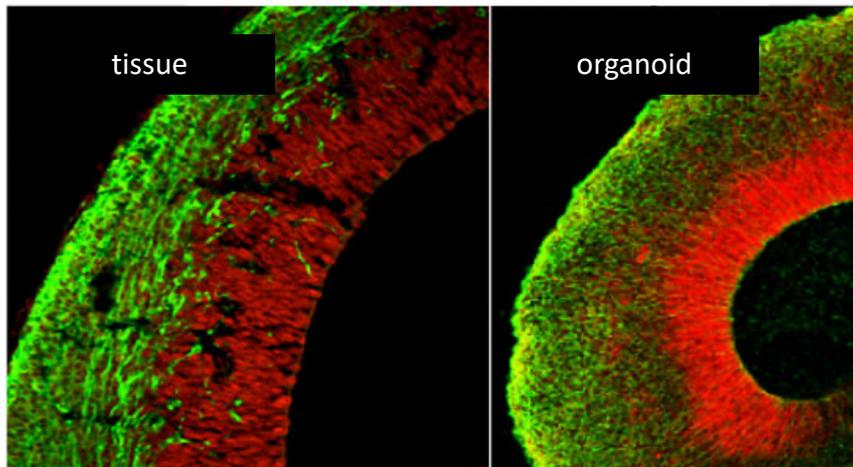
- **idrogel sintetici a base di acrilamide derivatizzati**
- **gel a base di collagene**
- **matrigel (una ECM secreta da una linea cellulare tumorale, arricchita in componenti della lamina basale)**
- **derivate dal tessuto di origine delle cellule**

COLTURE ORGANOTIPIICHE o ORGANOIDI

Clusters complessi di cellule organo-specifiche (es. bronchi/polmoni, fegato, cervello, mammella) **originati da cellule staminali o progenitrici**.

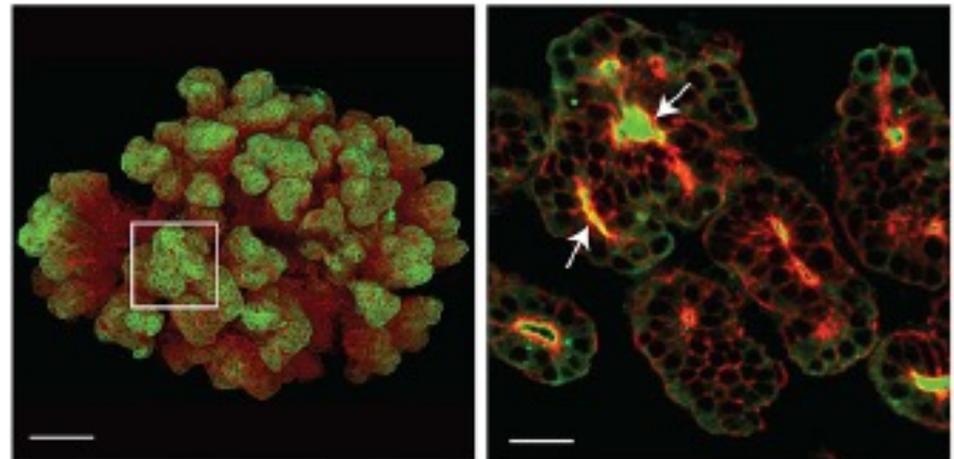
Si auto-organizzano attraverso la **localizzazione e il differenziamento** se coltivati in una opportuna matrice e grazie alla presenza di fattori solubili della nicchia staminale.

Brain



Repic & Lancaster , Plos Blogs 2013

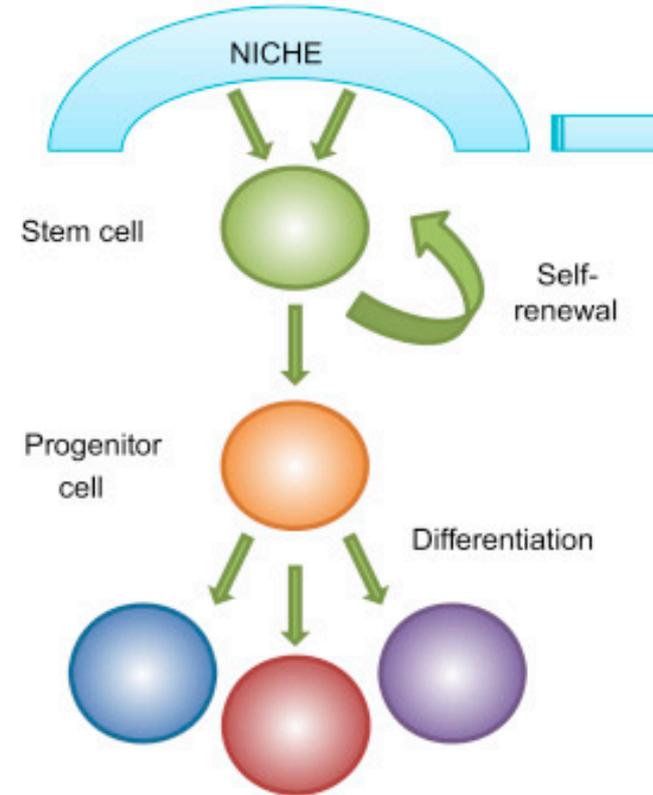
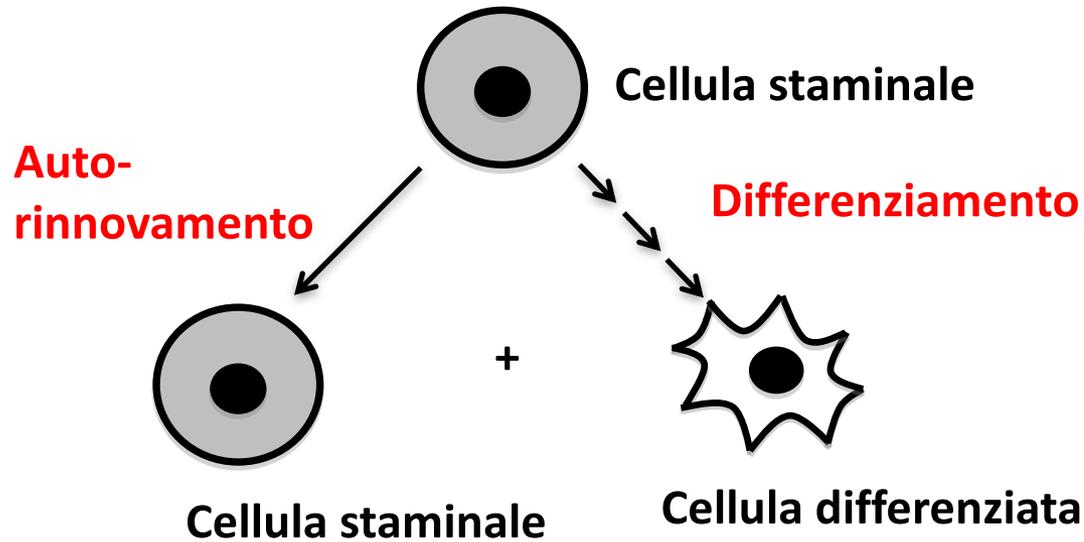
Mammary gland



Jamieson et al., Development 2017

Ricapitolano l'organizzazione e le funzioni
del tessuto/organo corrispondente

Le CELLULE STAMINALI hanno proprietà di **AUTORINNOVAMENTO** e **DIFFERENZIAMENTO**

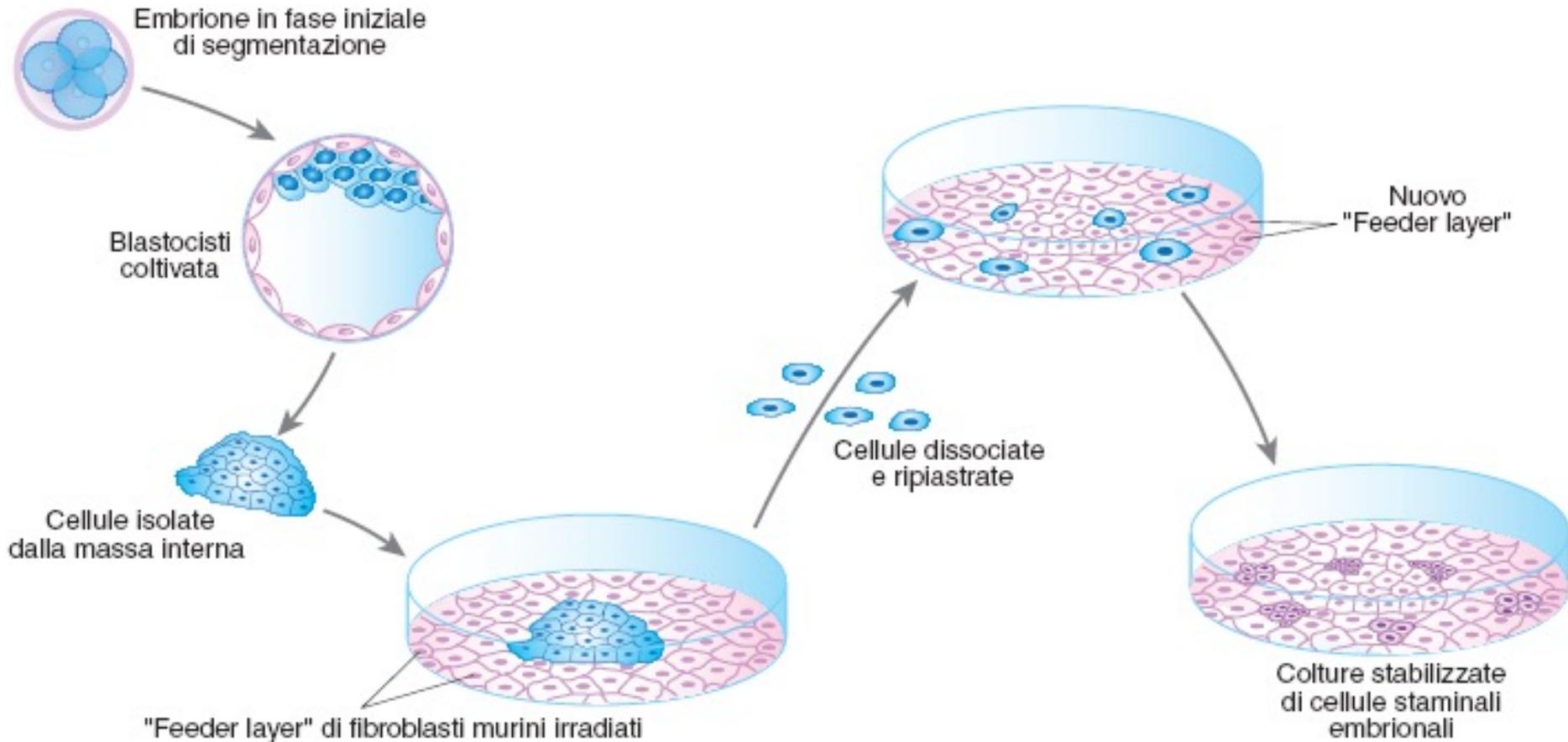


Generazione di ORGANOIDI

Gli organoidi possono essere derivati da 2 TIPI DI SCs

- a) **Cellule staminali pluripotenti** (PSCs)
(embryonic stem cells (ESCs) o iPSCs)
- b) ASCs = **cellule staminali adulte** tessuto-specifiche

Cellule staminali EMBRIONALI (ES)

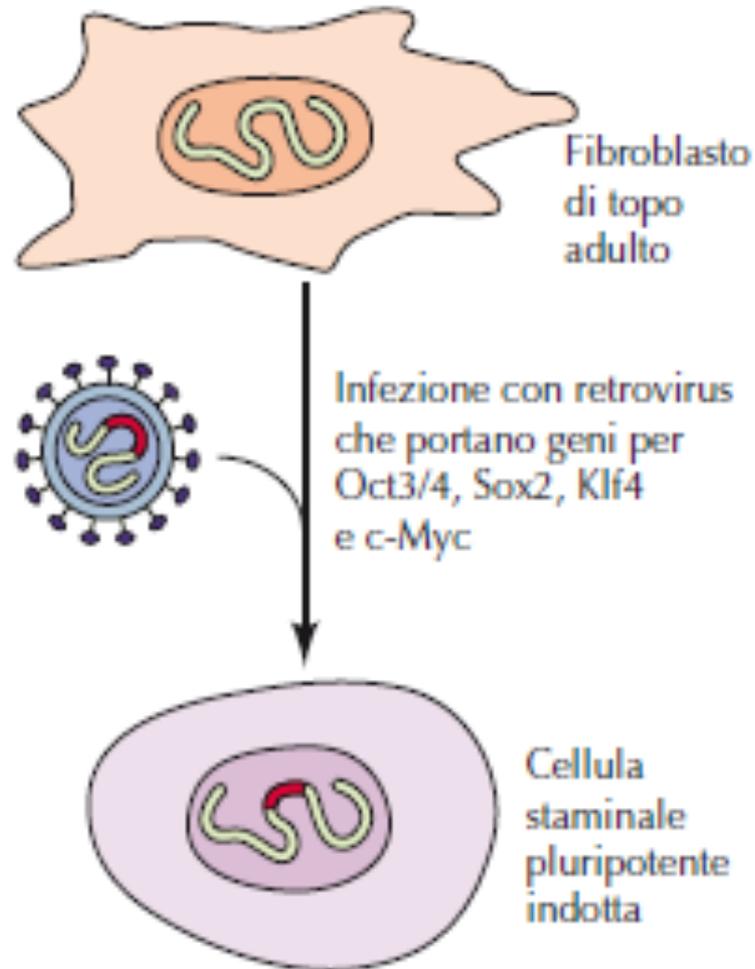


◆ **FIGURA 18.2**

Generazione di cellule staminali embrionali (cellule ES) dalla blastocisti.

iPS: cellule staminali pluripotenti indotte

S. Yamanaka + J. Gurdon: premio Nobel per la Medicina 2012



ESPERIENZA #2: CULTURE DI ORGANOIDI

Le cellule sono cresciute in matrici 3D (Matrigel) e sono ricoperte con un terreno di coltura contenente specifici fattori di crescita e differenziamento

Shamir & Ewald., Nat Rev MCB 2014

Matrix:

- matrigel
- Specific matrix components



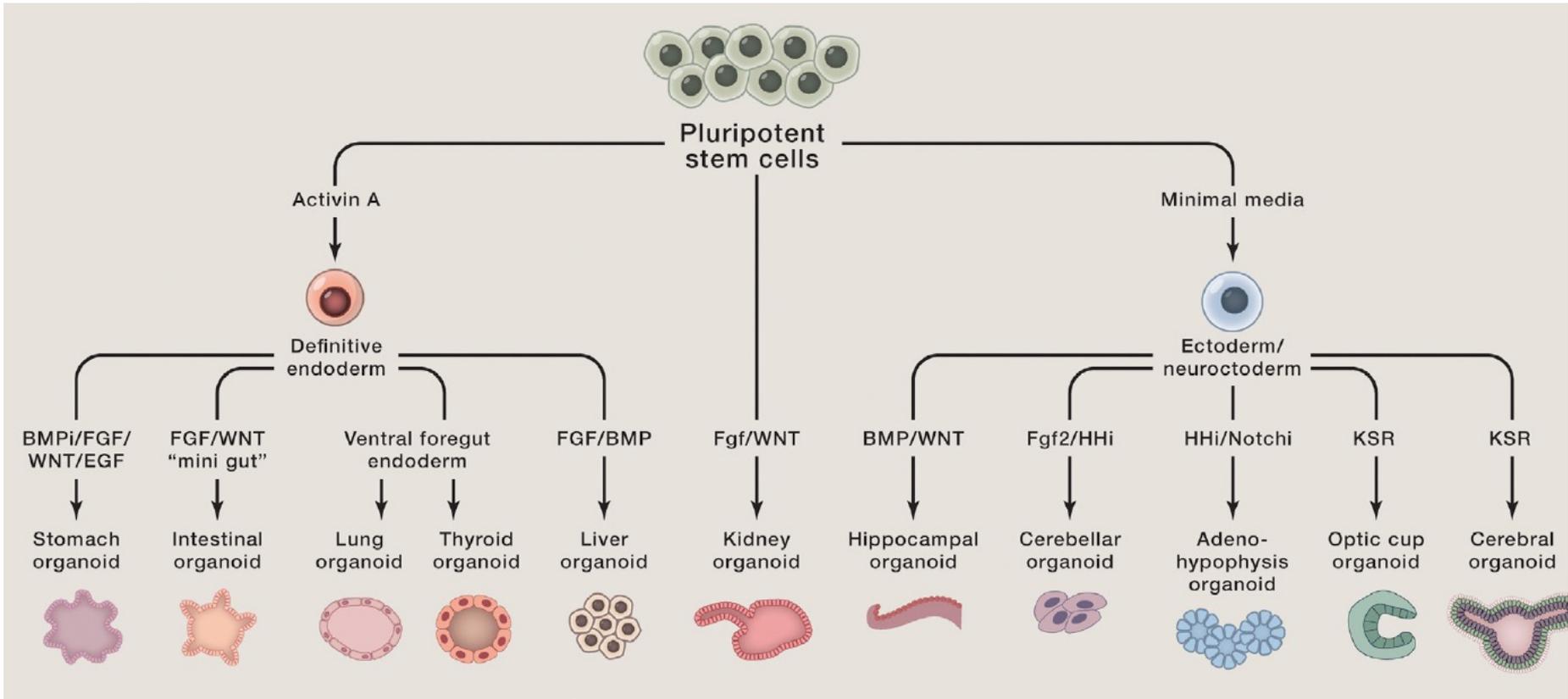
	HuBiogel ^{TM1}	Matrigel ²
Total Protein (mg/ml)	5-8	10-15
Laminin	260 +/- 24	810
Collagen I	478 +/- 32	n.s.
Collagen IV	312 +/- 18	450
Entactin	164 +/- 20	120
Tenascin	68 +/- 6	n.s.
Fibronectin	18 +/- 4	n.s.
Proteoglycans	14 +/- 6	25
EGF	None	0.7 ng
TGF-B	None	3 ng
bFGF	None	0.2 pg
PDGF	None	12 pg
VEGF	None	16 ng
Collagenases	None	detectable

Medium:

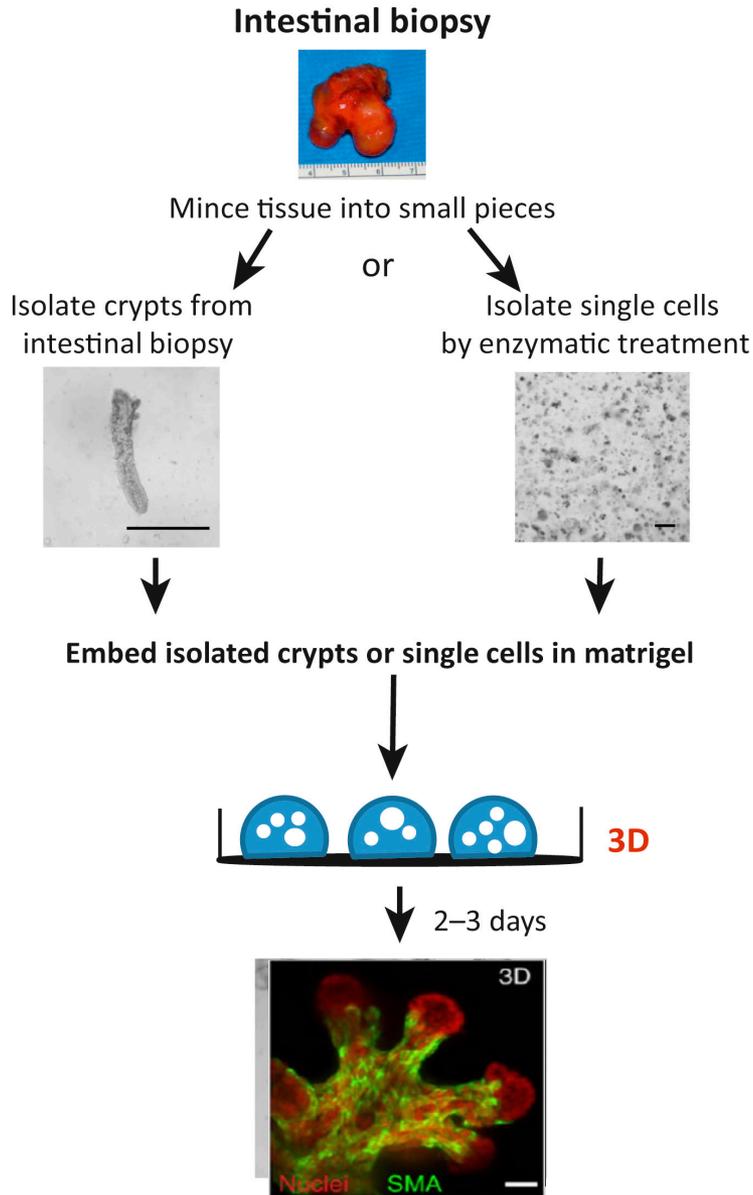
- Specific growth factors (niche): e.g. FGF, EGF, activators of WNT and NOTCH pathway



ORGANOIDI da cellule staminali pluripotenti



generazione di ORGANOIDI da TESSUTI ADULTI (ASCs)

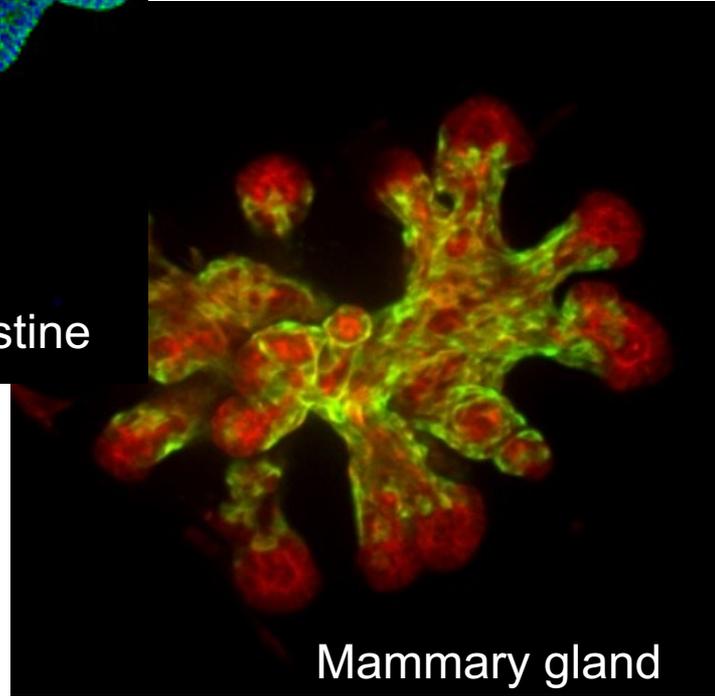
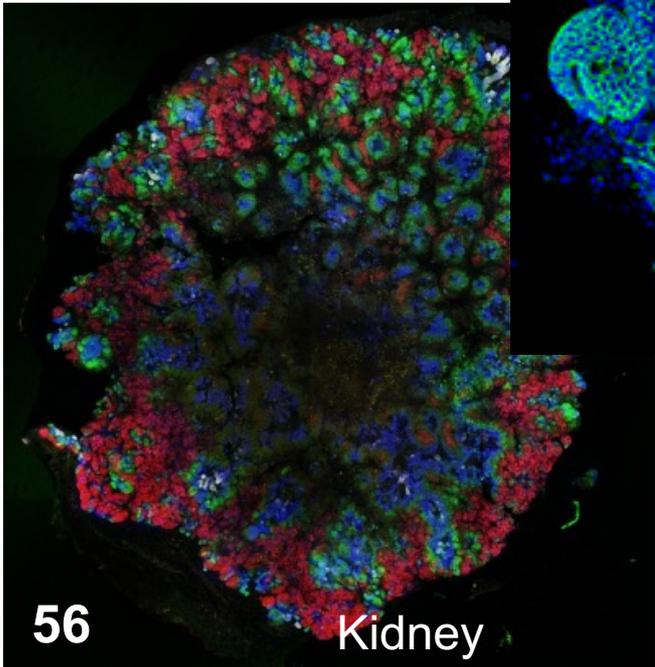
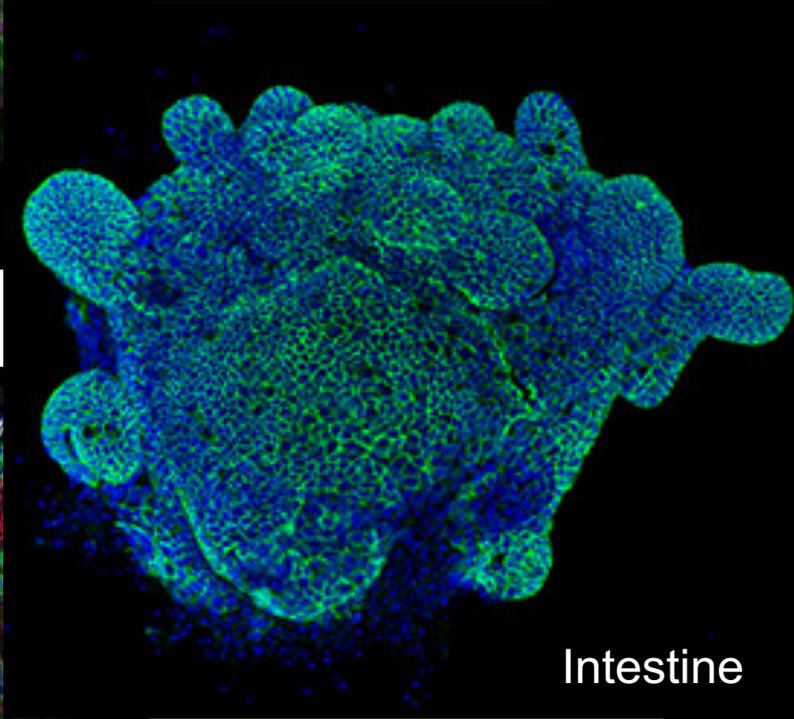
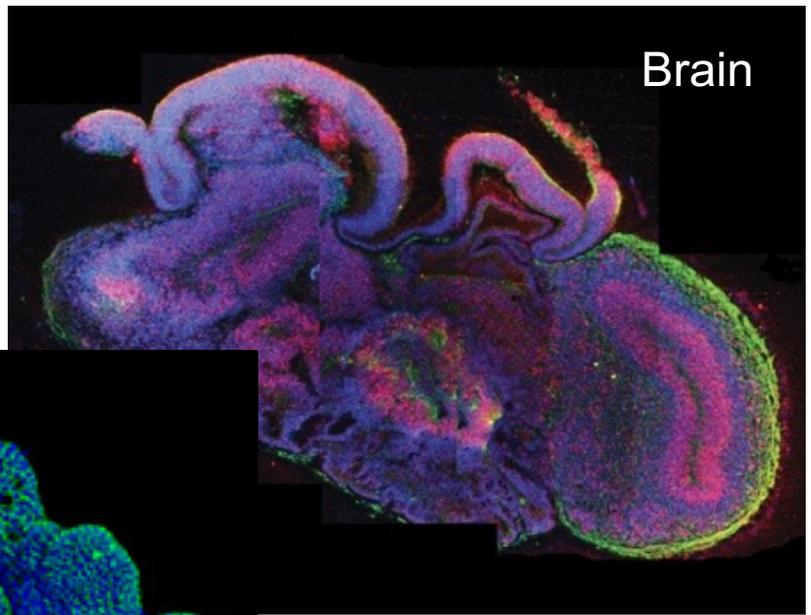
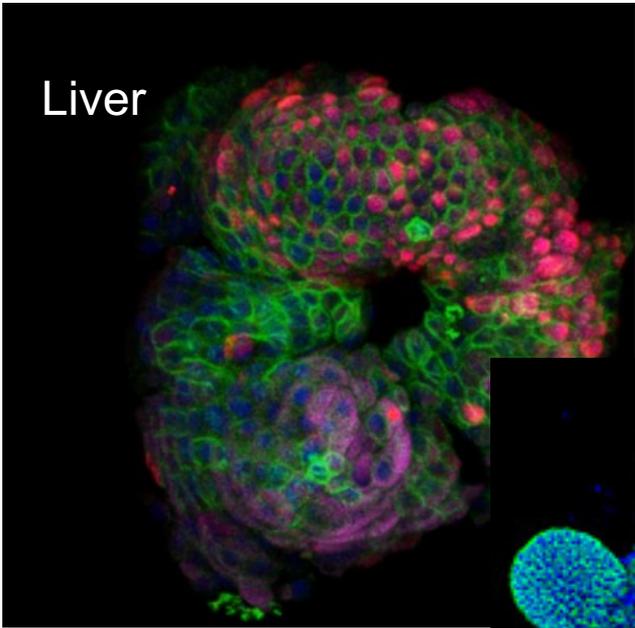


MATERIALE DI ORIGINE:

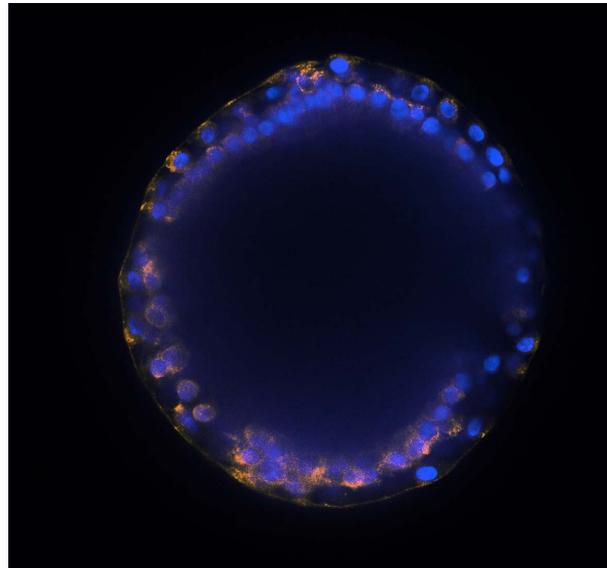
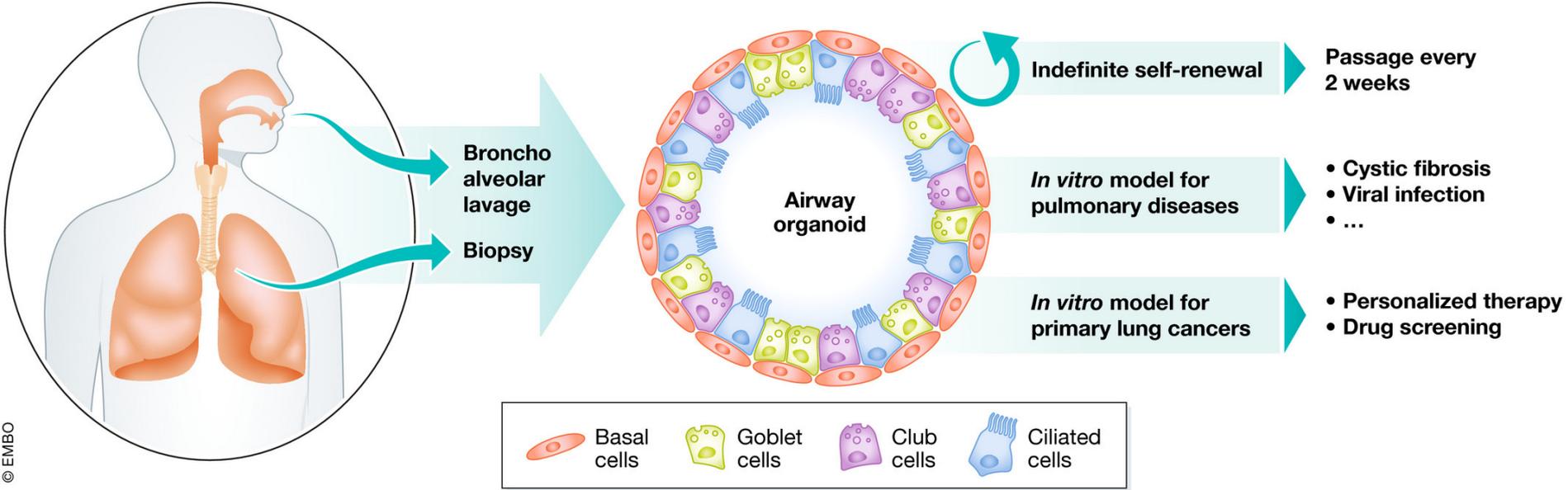
-ASCs singole (dissociate/purificate)

-Porzioni di tessuto (in alcuni casi le ASCs necessitano di cellule di supporto per la crescita)

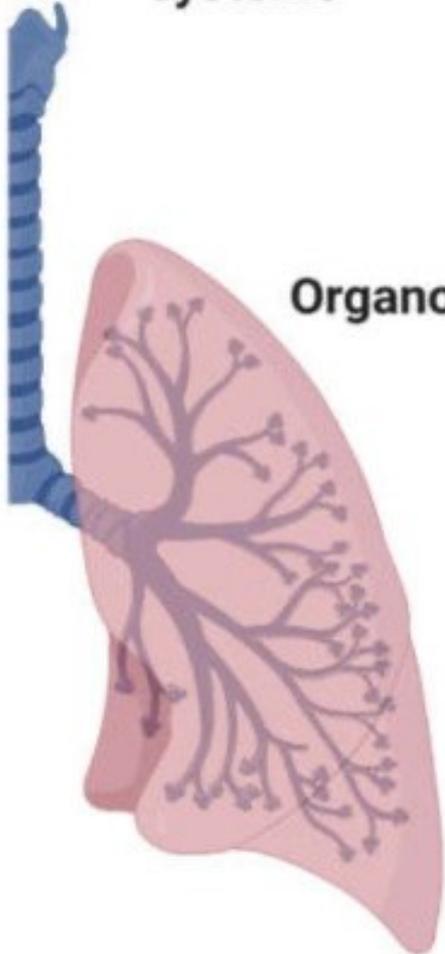
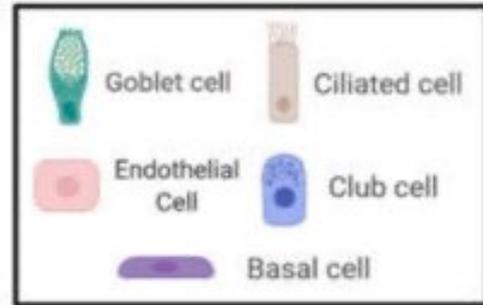
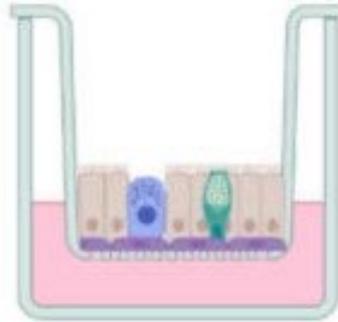
<https://vimeo.com/222833601>



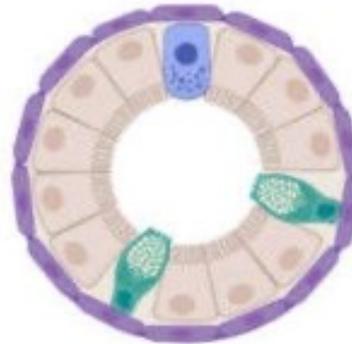
Human airway organoids



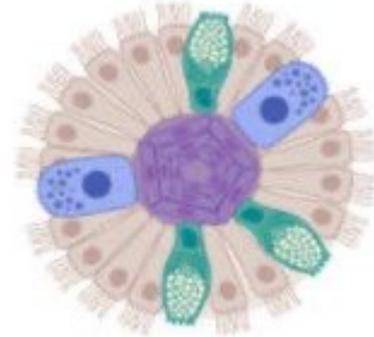
Air-liquid interface transwell systems



Organoids

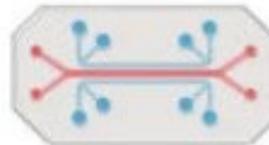


Apical-inward

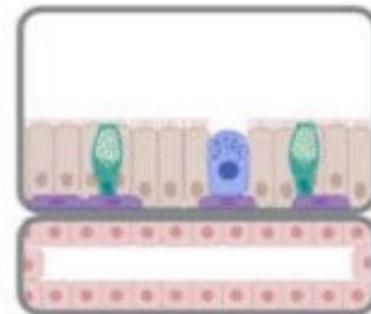


Apical-outward

Organ on a chip model

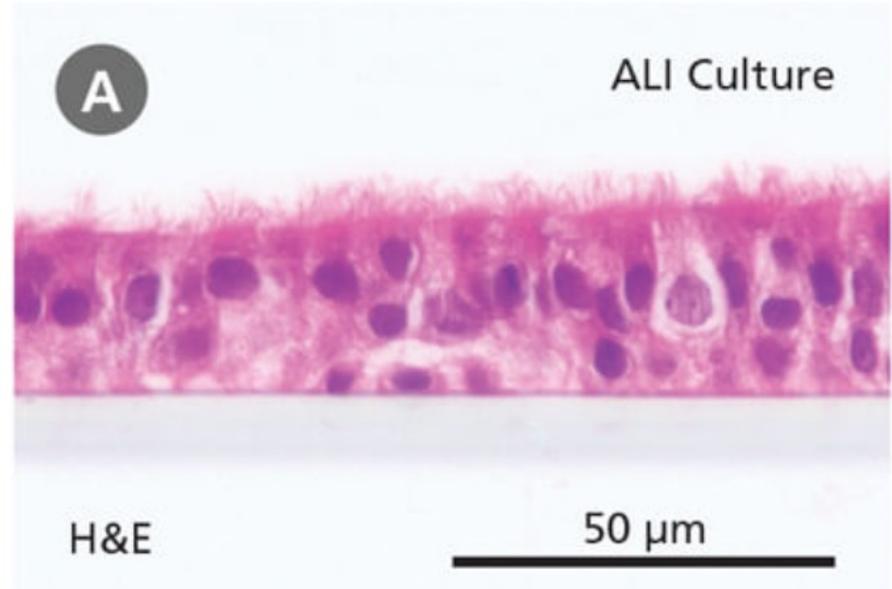
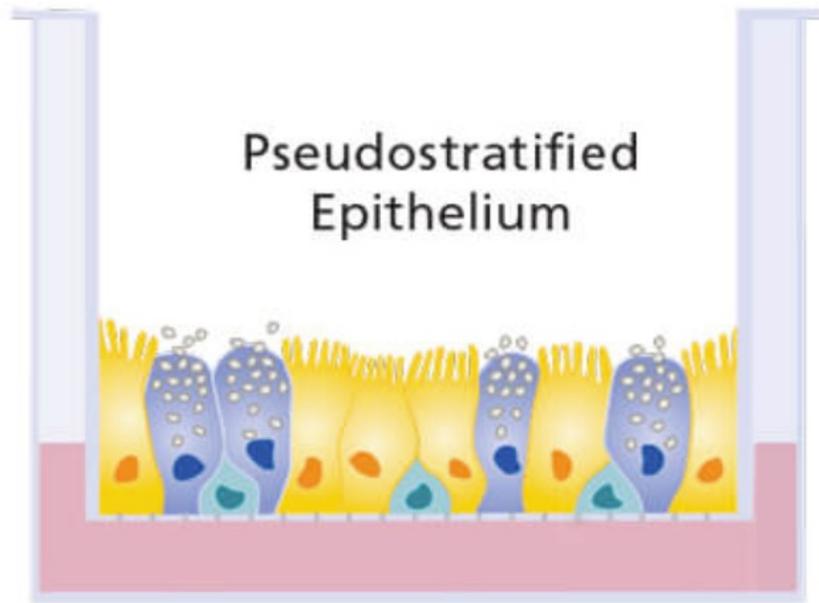


Top-view



Cross-section

Colture ALI per lo studio del SARS-CoV-2



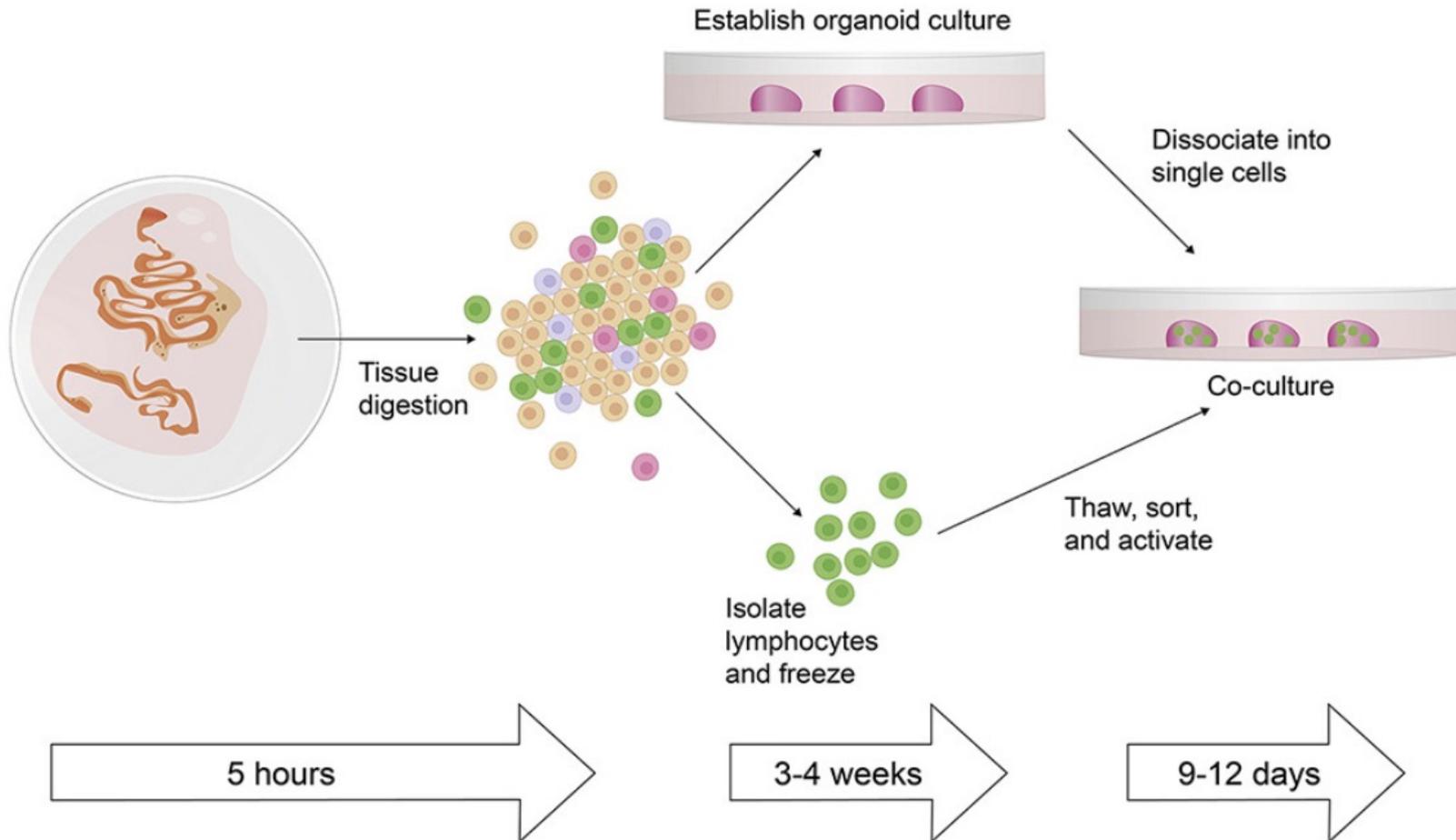
Early Studies of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2 with ALI Culture

In order to isolate and identify a novel pathogen causing illness in China, researchers infected ALI cultures of pathogen-free human airway epithelial cells with fluid from patients showing symptoms. This human airway infection model allowed the scientists to isolate the virus that was reproducibly infecting human lung cells, sequence its genome, and investigate elements of its pathogenesis with transmission electron microscopy.

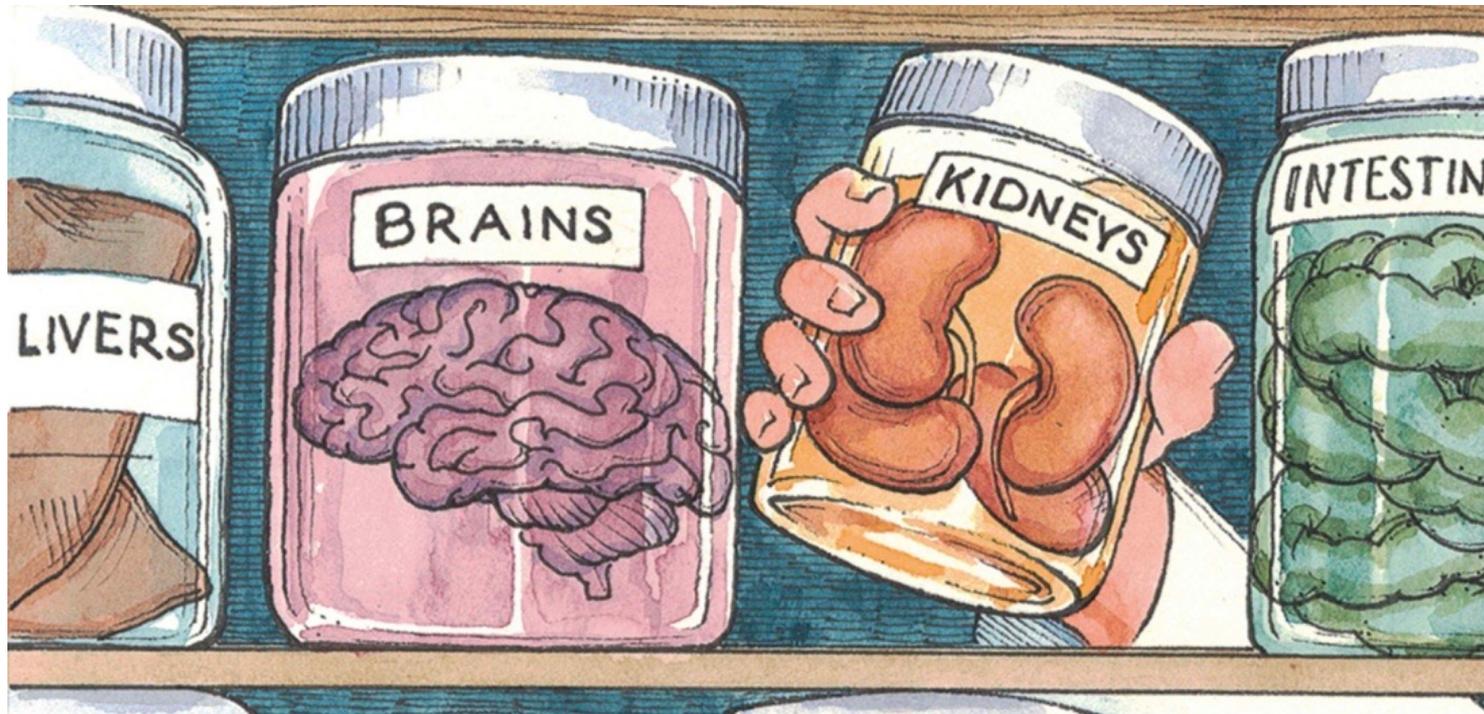
Zhu N et al. (2020) [A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China](#). N Engl J Med. 382(8):727–33

- Submerged culture of primary HBECs is possible; however, cells in this system fail to undergo mucociliary differentiation and thus do not accurately represent the in vivo airway.
- ALI culture of primary human airway cells is uniquely suited as a model for in vitro infection studies. This is due to the ability of ALI cultures to faithfully recapitulate key characteristics of the in vivo airway. For example, ALI cultures exhibit **relevant proportions of airway cell types, appropriate cellular polarization and junctional properties, dynamic physiologic processes such as mucus secretion and coordinated ciliary beating, and physiological expression and subcellular localization of characteristic proteins bearing species-specific sequences.** Depending on the infection mechanism of the virus under study, each one of these properties can be a crucial feature of the model system. Human airway ALI cultures allow for efficient infection of cultured cells and have been used to model various mechanisms of viral pathogenesis and human disease. **This includes investigating protein interactions during intracellular replication,¹ factors impacting viral entry into cells,² and infection kinetics.³** The utility of ALI cultures for studying viral infection represents a valuable tool for developing antiviral therapeutic approaches;⁵ viral neutralization by monoclonal antibodies has also been tested in this model.⁸
- The defining feature of ALI culture is that the basal surface of the cells is in contact with liquid culture medium, **whereas the apical surface is exposed to air.** A common approach is to seed cells onto the permeable membrane of a cell culture insert, which is initially supplied with culture medium to both the apical and basal compartments (Figure 2A). Once confluence is reached, the cells are subjected to 'air-lift', where the medium is supplied only to the basal chamber (Figure 2B). This configuration mimics the conditions found in the human airway and drives differentiation towards a mucociliary phenotype. **60**

Ricostruzione di fenotipi complessi: co-coltura di diversi tipi cellulari (Es. microambiente immune/infiammatorio)



Applicazioni: biobanche di organoidi da pazienti per lo studio di patologie umane

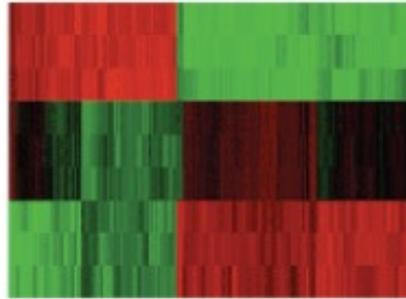


Applicazioni degli organoidi in biomedicina

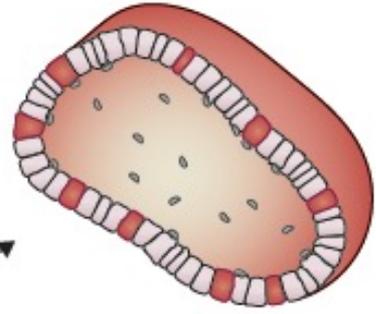
b Patient-derived tissue subunits



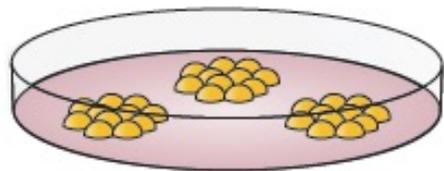
c Omics profiling



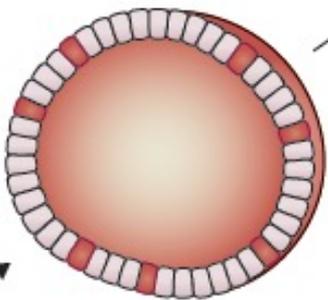
d Study host-microbe interaction



a



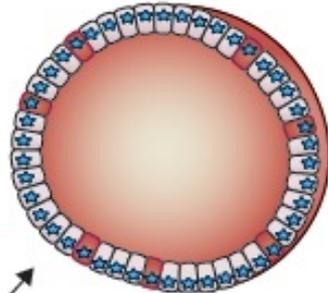
ESCs/iPSCs



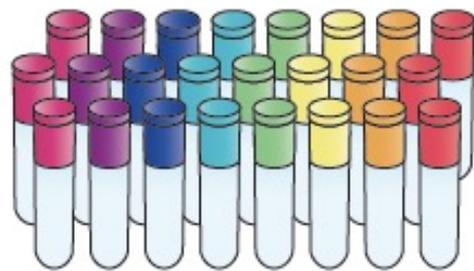
e Gene editing (e.g. CRISPR)



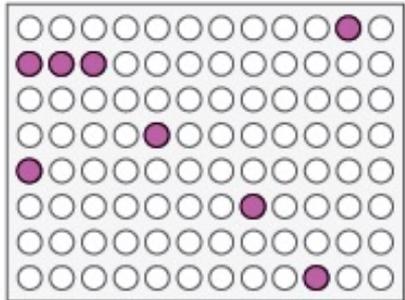
Targeted correction of mutations



g Biobank for academic studies

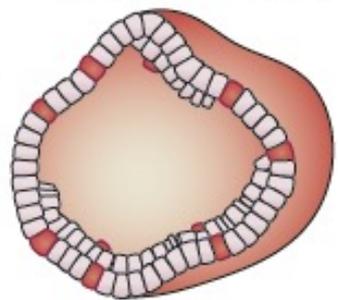


f High-throughput drug screening



● Potential lead

Disease modelling



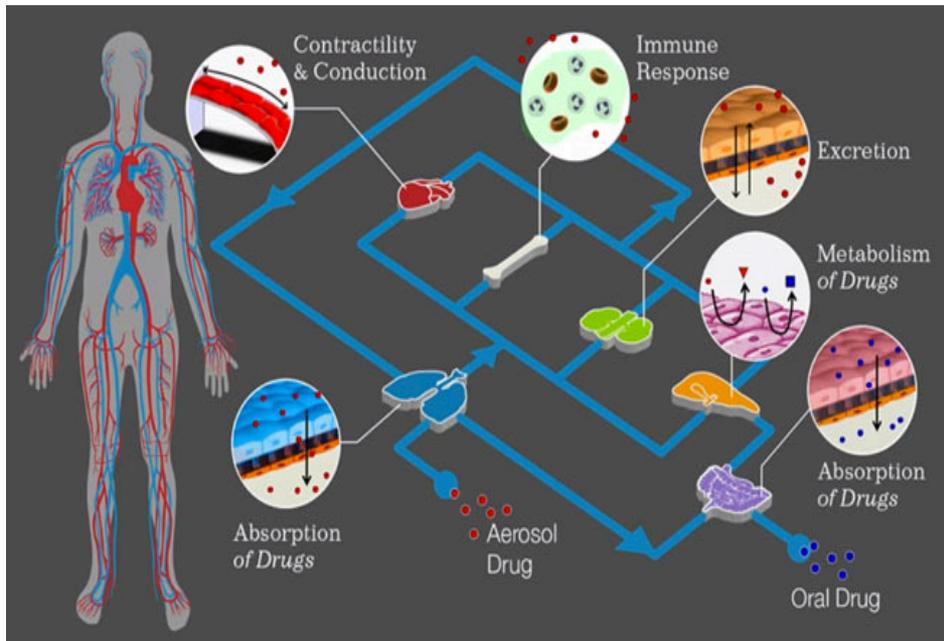
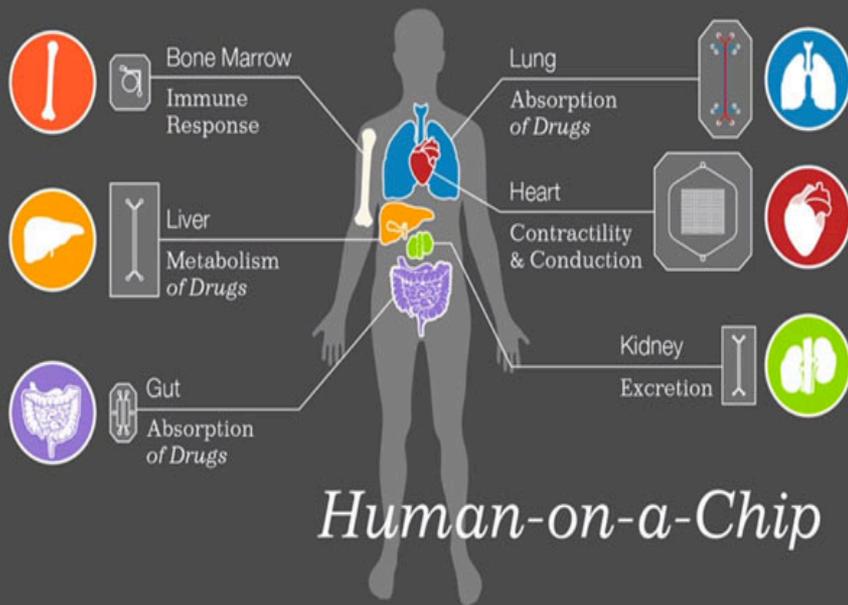
Applicazioni: organ-on chip, human-on-chip

Dispositivi microfluidici

Composti da camere perfuse in maniera continua

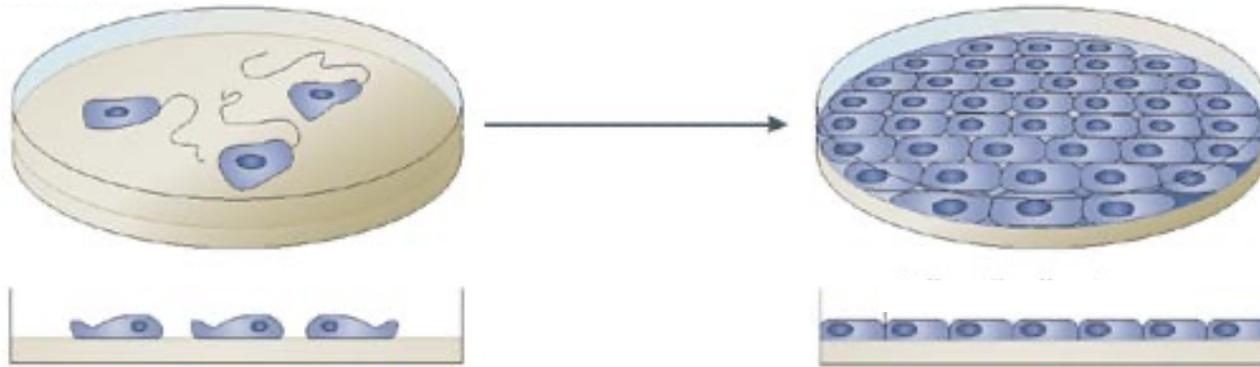
Interfacce tissutali realizzate con membrane

Simulano l'organizzazione e la funzione a livello di organo e multi-organo



**ESPERIENZA #1:
PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA**

Le cellule seminate in adesione proliferano fino ad occupare tutta la superficie del recipiente = raggiungono la **CONFLUENZA**



Quindi smettono di proliferare = **INIBIZIONE DA CONTATTO**.

Se vengono diluite (**PASSAGGIO IN CULTURA**)

in modo da fornire loro nuovo spazio, ricominceranno a proliferare.

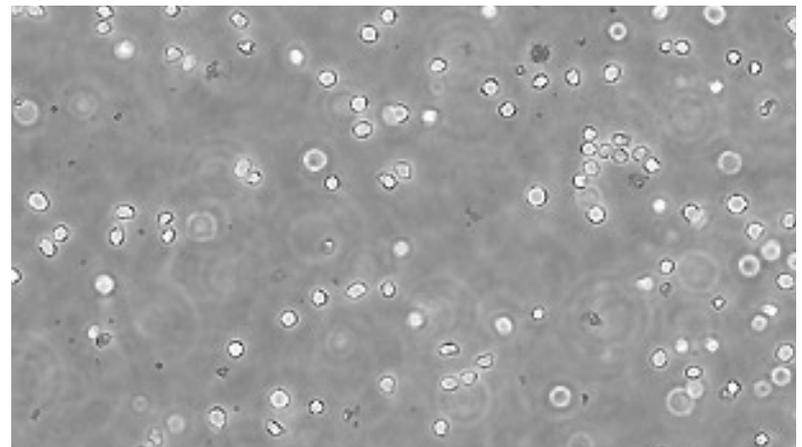
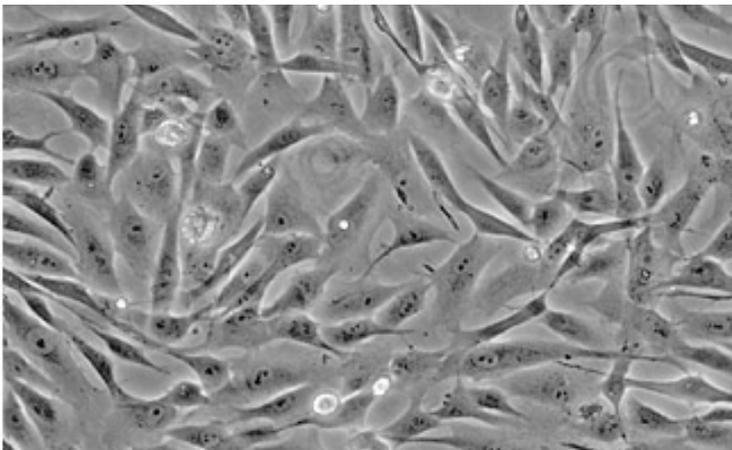
ESPERIENZA #1: PASSAGGIO DI CELLULE IN CULTURA

SCOPO:

**diluire una coltura di cellule che ha raggiunto una elevata confluenza
(o una elevata concentrazione)**

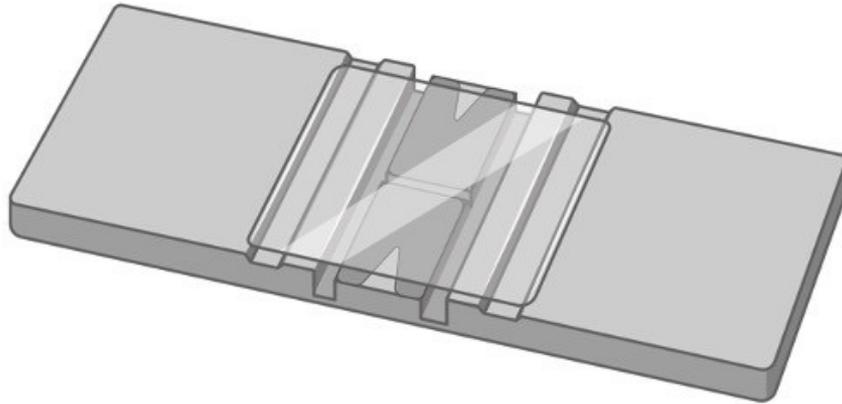
**in modo da fornire spazio e risorse (metaboliti, fattori di crescita)
per consentirne la proliferazione in coltura.**

- 1 **osservare** il grado di **confluenza** delle cellule al microscopio
- 2 rimuovere e **lavare** il terreno che contiene inibitori della tripsina.
- 3 **dissociare** le cellule con **tripsina/EDTA**
- 4 **staccare** bene le cellule dal fondo della flask e tra loro: appariranno **TONDEGGIANTI E GALLEGGIANTI**.

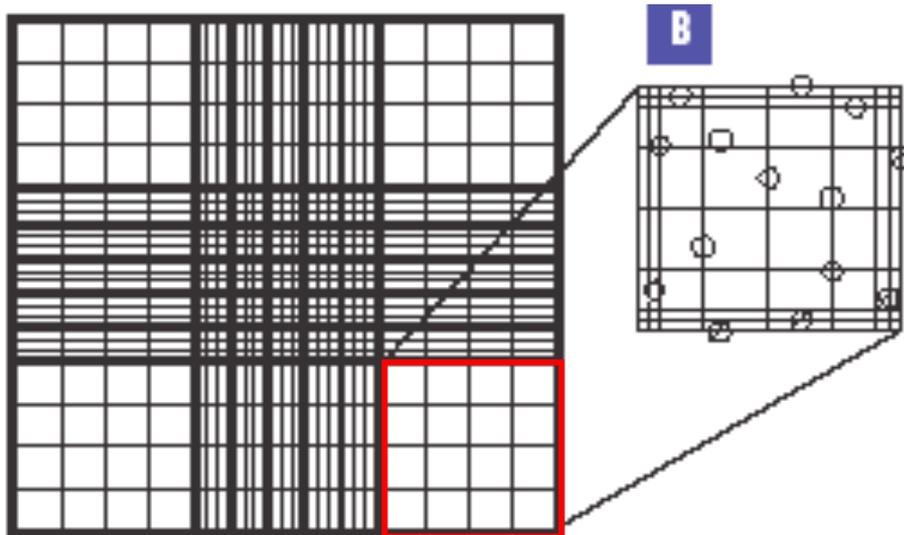


- 5** neutralizzare la tripsina con il terreno completo
- 6** centrifugare la sospensione cellulare per recuperare le cellule
- 7** risospendere le cellule in terreno nuovo
- 8** contare le cellule per stabilirne la concentrazione iniziale e quindi diluirle alla concentrazione stabilita.

8 Conta delle cellule all' emocitometro (cameretta di Neubauer)



La **concentrazione** delle cellule (numero di cellule in 1 ml di sospensione) viene ricavata contando il **numero** di cellule in un **volume** noto ($1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$).



9 CALCOLARE LA CONCENTRAZIONE INIZIALE DELLE CELLULE:

n° di cellule in un quadrato $\times 10^4 = n^\circ$ di cellule in 1 ml di sospensione

In seguito è possibile utilizzare l'automated cell counter per confrontare la misura della concentrazione della sospensione cellulare effettuata dallo strumento.

10 DILUIRE LE CELLULE

La **concentrazione finale** di cellule che si vuole seminare è 1.0×10^5 /ml.

Il **volume finale** di cellule che si vuole porre nel nuovo recipiente (capsula Petri da 60 mm di diametro) è **5 ml**.

Per effettuare la diluizione seguire il seguente procedimento:

*Se la sospensione iniziale contiene cellule/ml, quanti ml (= X)
dovrò usarne per preparare 5 ml di sospensione finale contenente 1.0×10^5 cellule/ml?*