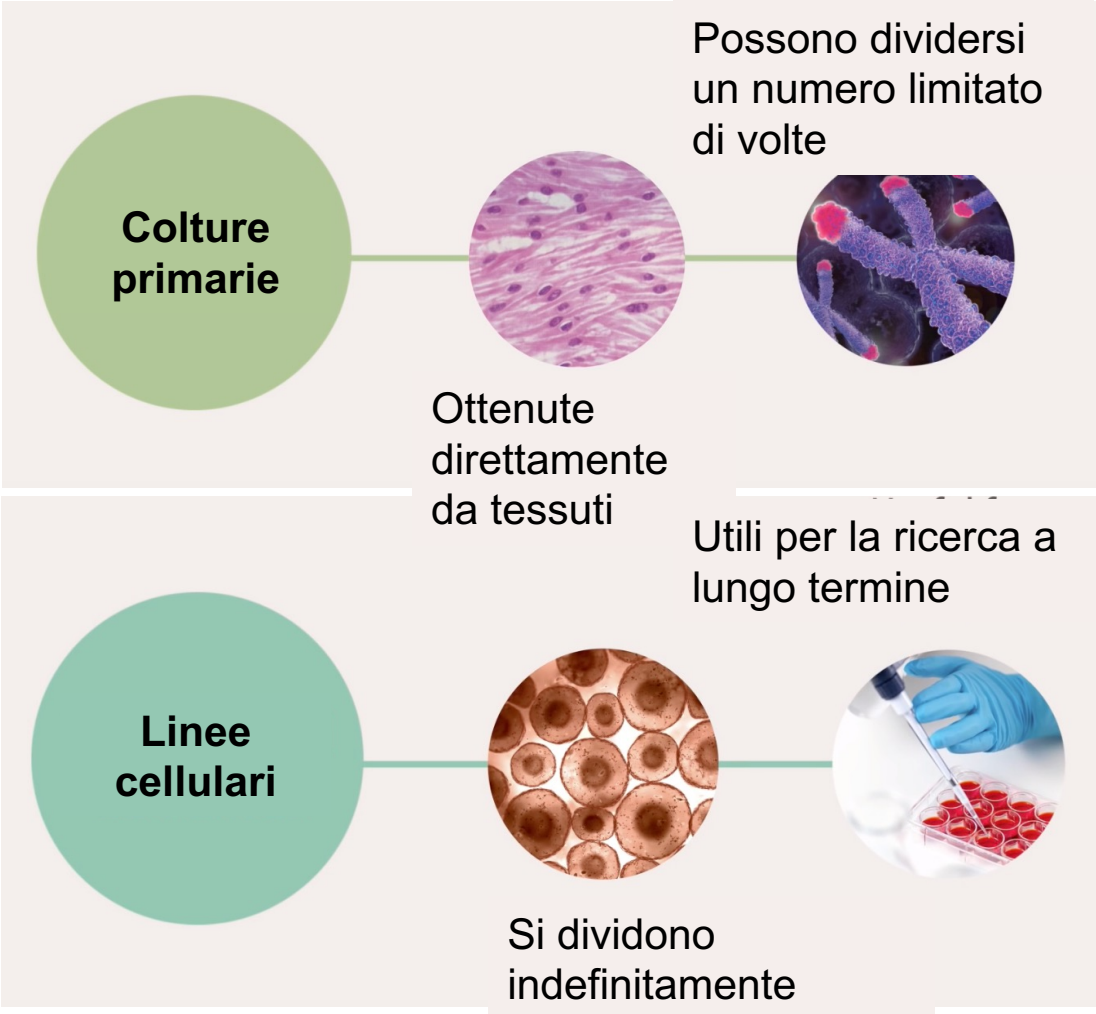
CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2026-2027

Corso di Biotecnologie Cellulari

LEZIONE 3
MODELLI CELLULARI 3D

Colture primarie e linee cellulari in 2D



VANTAGGI:

Facilità di mantenimento, amplificazione e analisi:

Disponibilità di grandi quantità di materiale

Analisi biochimiche e di biologia molecolare

Esperimenti high-throughput (es. screening)

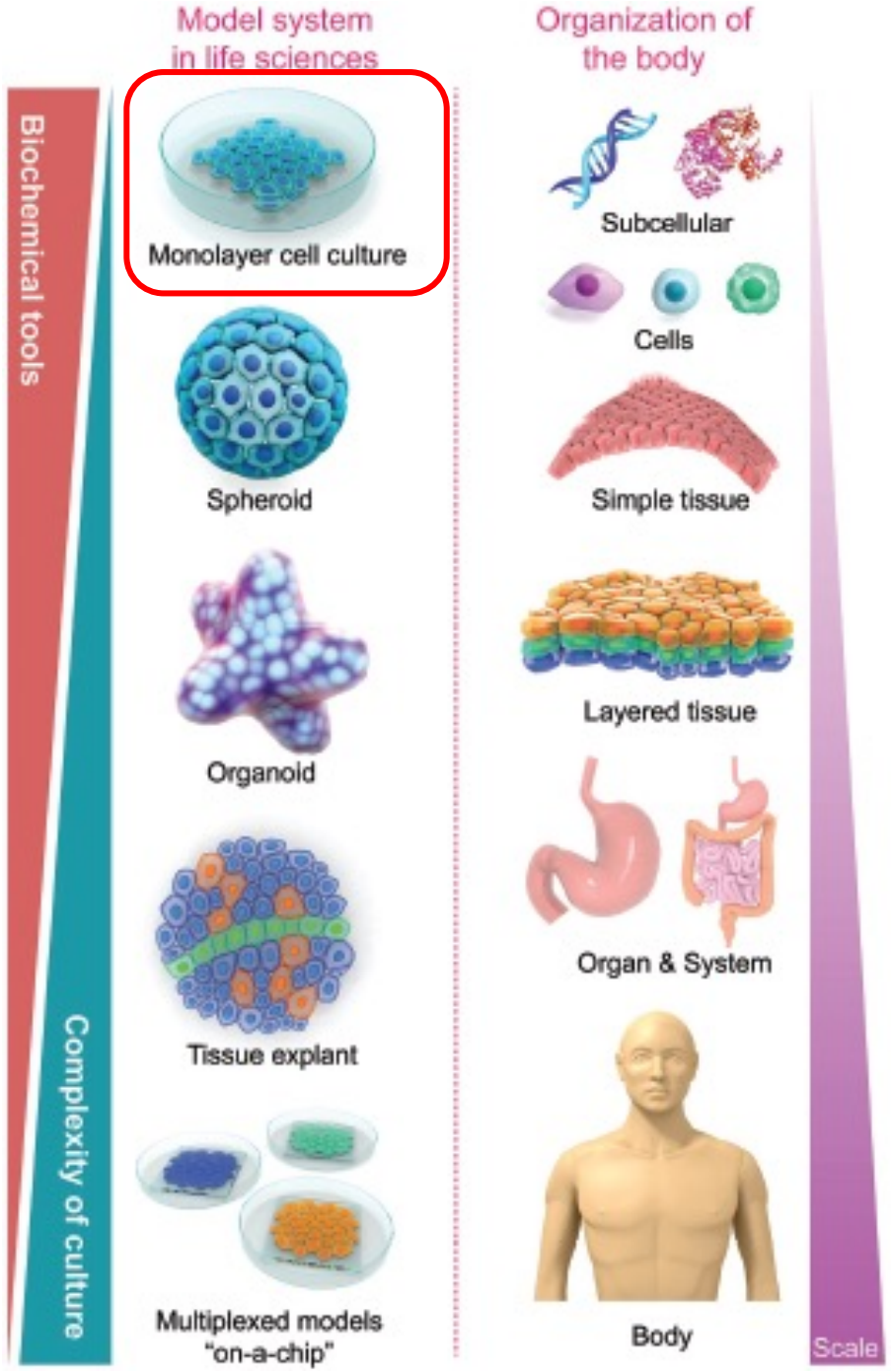
Modelli cellulari 2D

VANTAGGI:

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

LIMITI:

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

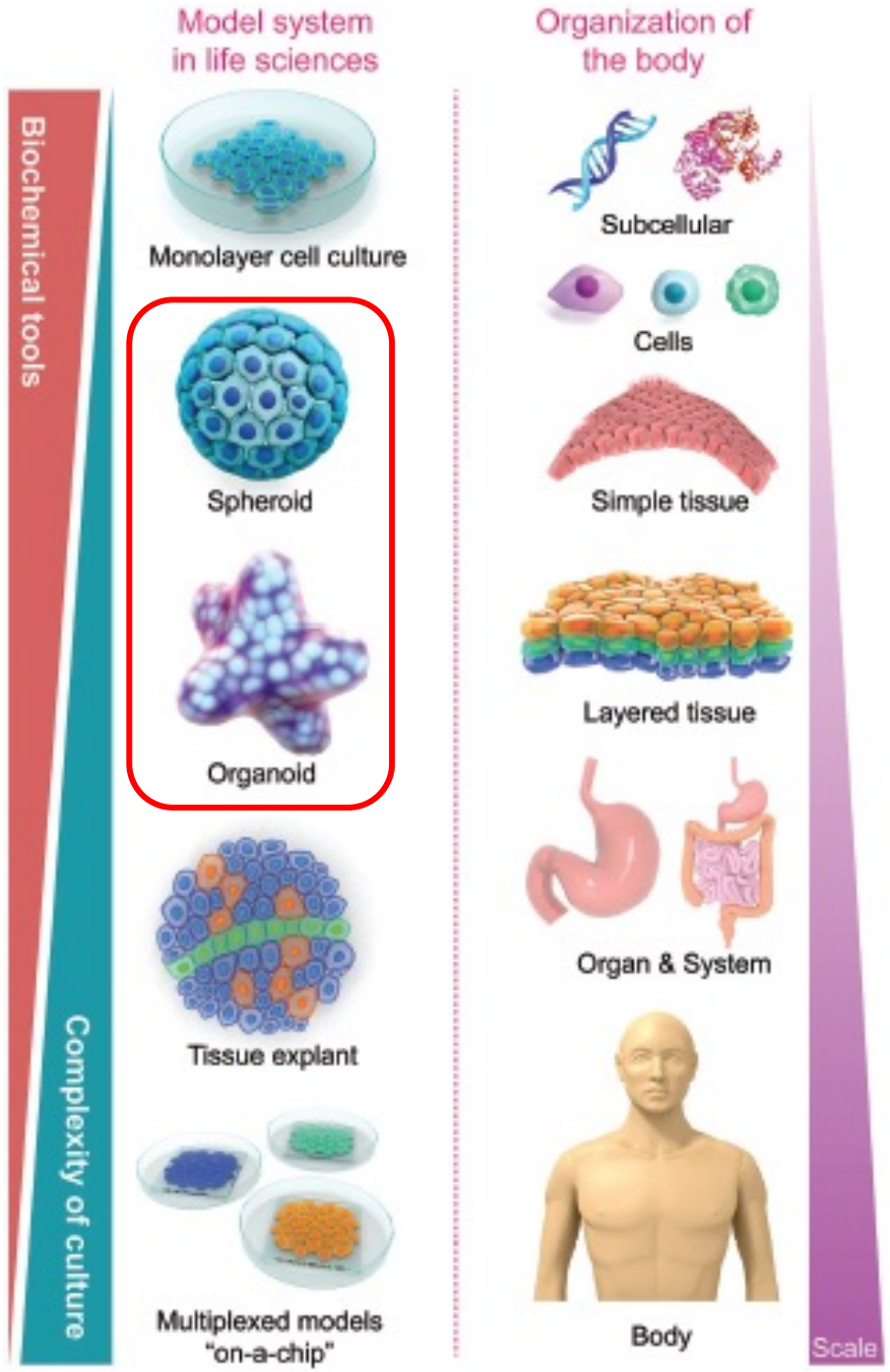


Colture cellulari 3D

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

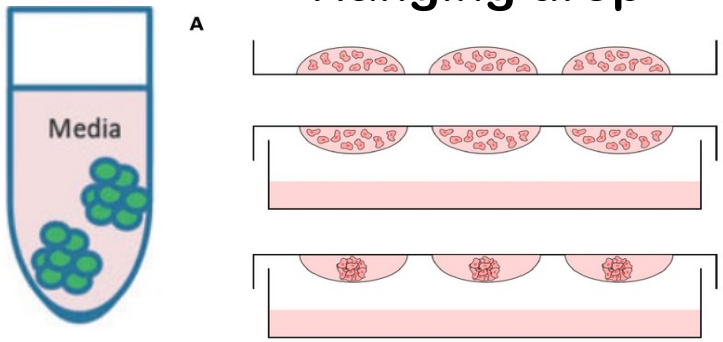
Possono ricapitolare l'organizzazione (architettura), le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice del tessuto di origine.

Possono essere mantenute in terreno liquido o semisolido
(in matrici sintetiche o derivate da tessuti).

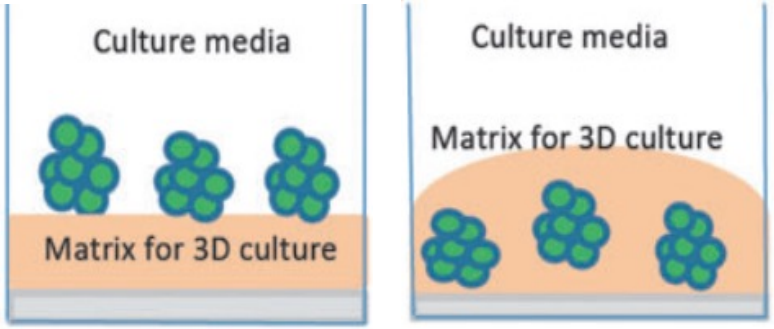


Modalità di coltura 3D

Hanging drop

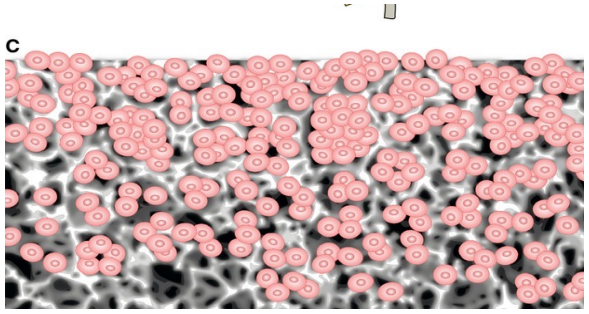


Terreno liquido



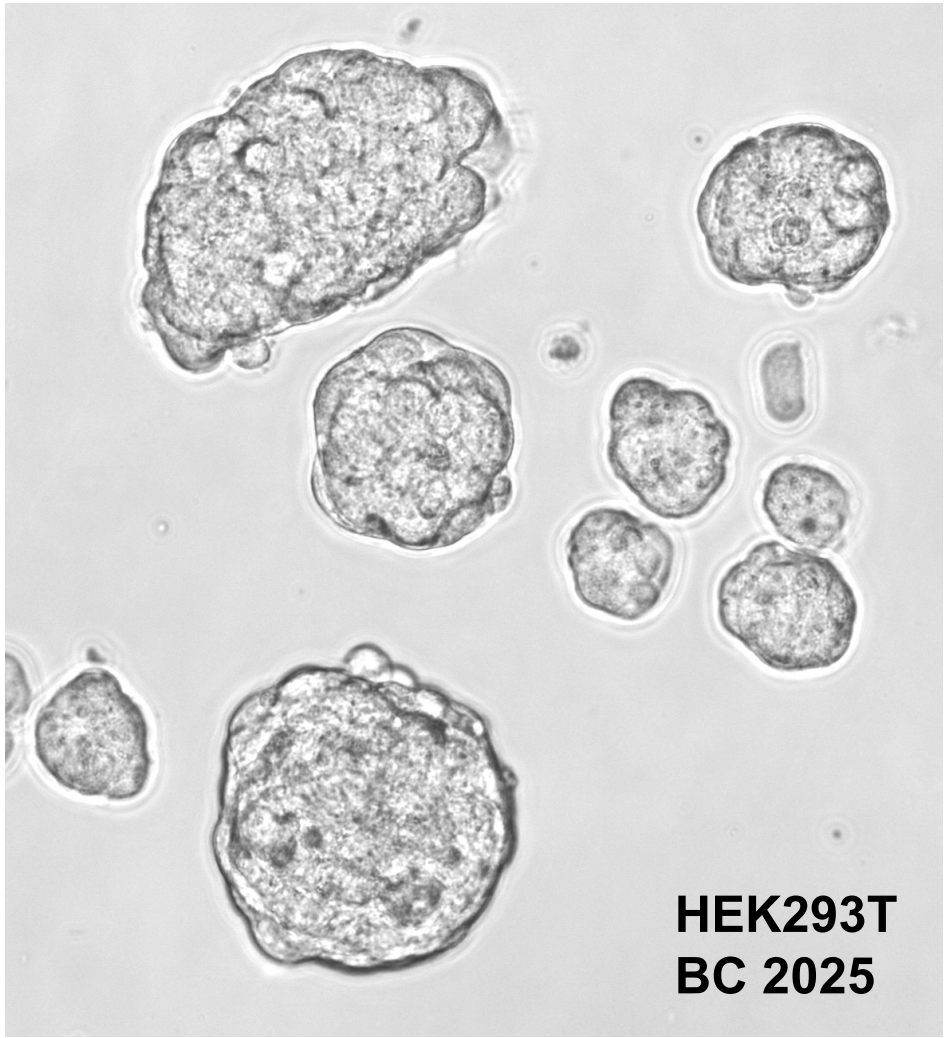
Matrice/ idrogel

- idrogel sintetici a base di acrilamide derivatizzati e coated con fibronectina
- gel a base di collagene
- matrici decellularizzate, es. Matrigel (una ECM secreta da una linea cellulare tumorale, arricchita in componenti della lamina basale)



Scaffold poroso

SFEROIDI



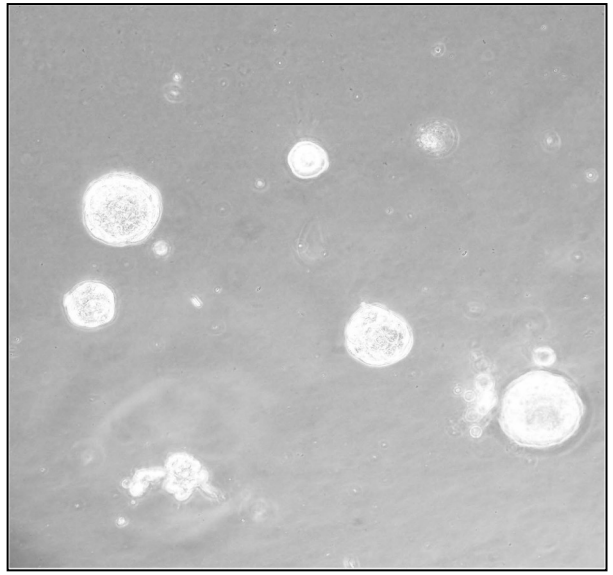
Sono clusters di cellule che si formano per la tendenza di molti tipi cellulari ad aggregare spontaneamente attraverso giunzioni intercellulari se coltivati in 3D (condizioni non aderenti).

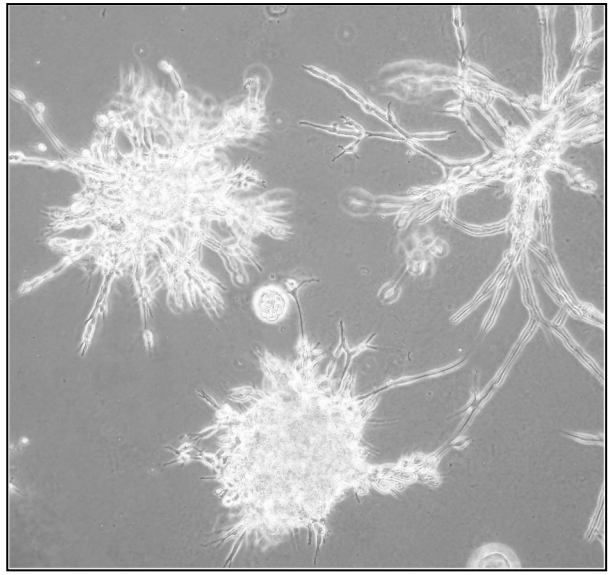
Ricapitolano l'organizzazione spaziale/architettura di un tessuto semplice.

Anche se non ricapitolano l'organizzazione gerarchica delle popolazioni cellulari in un tessuto differenziato, possono mostrare un limitato grado di eterogeneità (in base a parametri spaziali e gradienti biochimici).

Sferoidi normali e tumorali

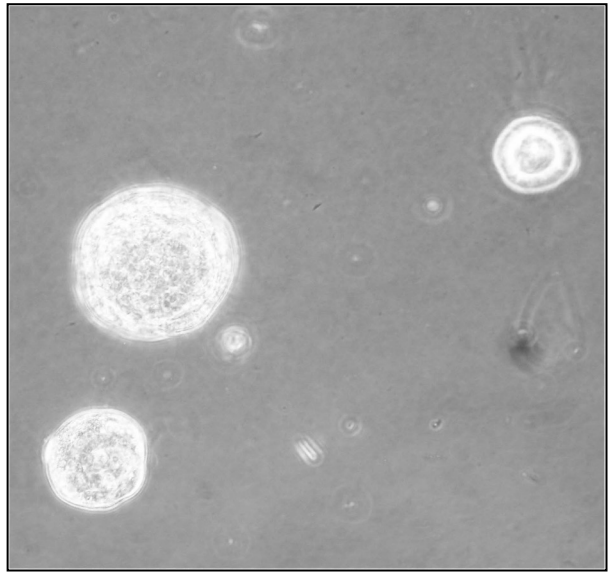
Human Breast epithelial cells

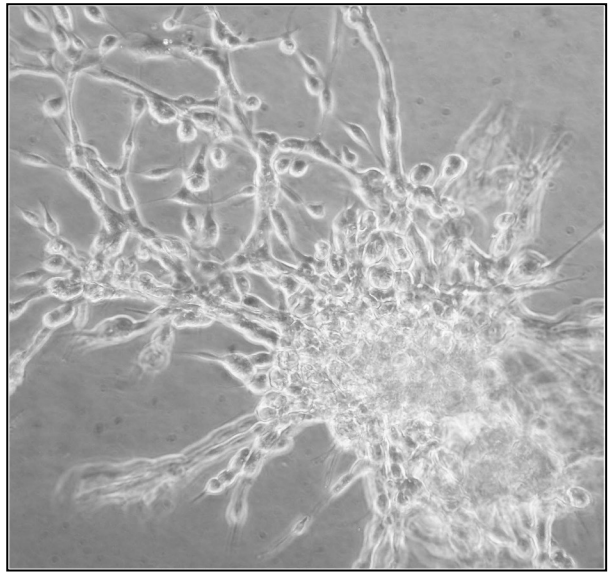




Brightfield ingrandimento

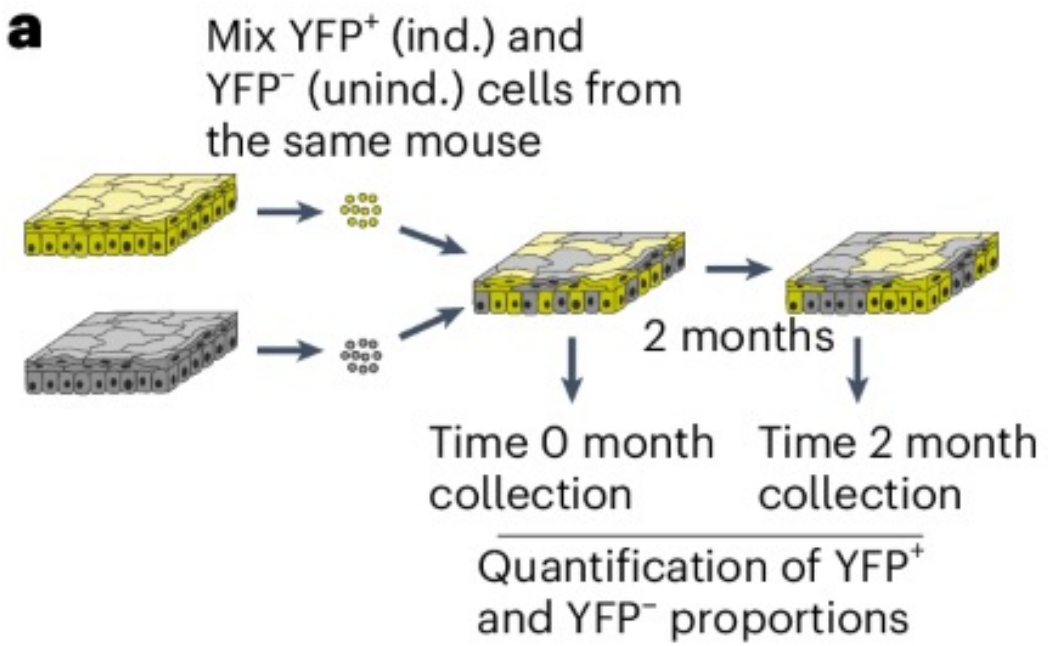
100x

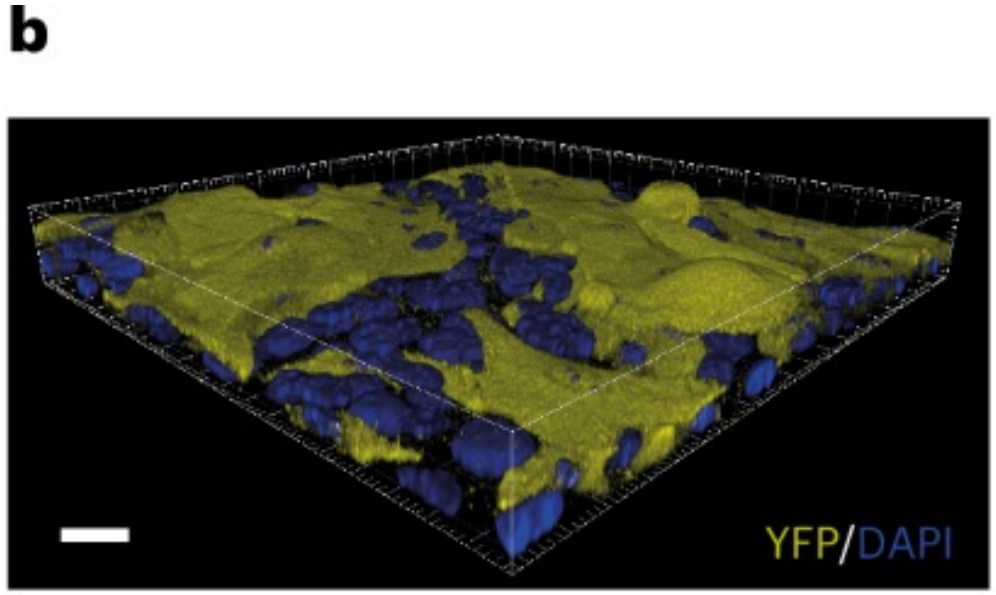




200x

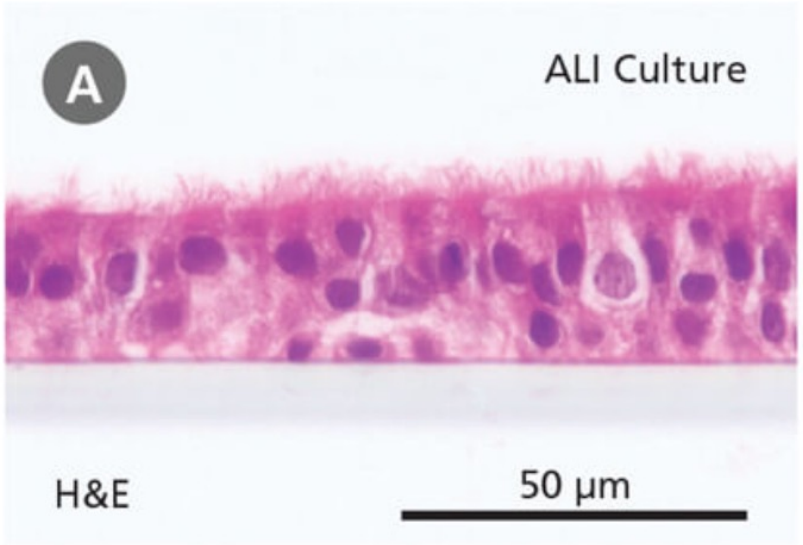
3D epithelioid cultures recapitulate tissue architecture through cellular self-organization



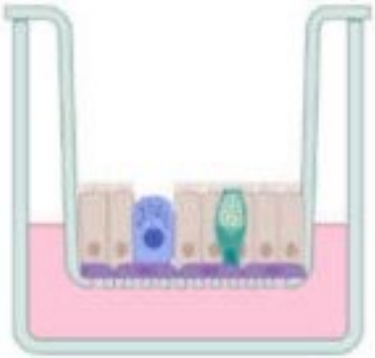


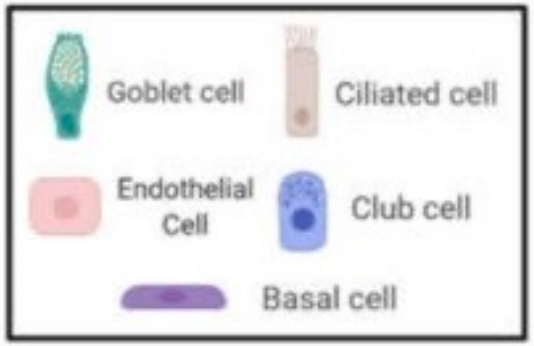
Sono colture 3D nelle quali cellule epiteliali possono proliferare, auto-organizzarsi e mantenere una popolazione stabile per periodi prolungati, formando strutture che riproducono alcune caratteristiche dell'architettura epiteliale.
Vantaggi: lunga durata, facili da manipolare.

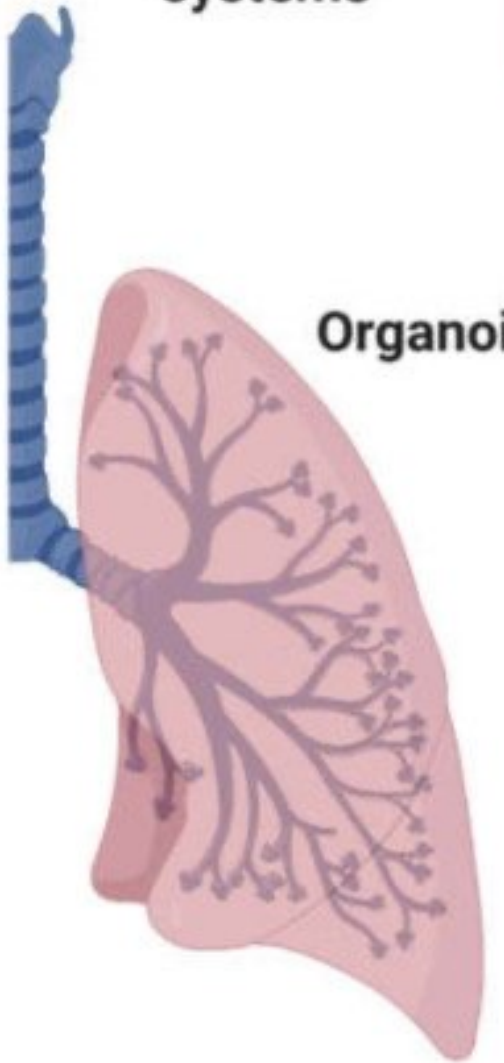
Colture ALI (air-liquid interface)



Air-liquid interface transwell systems



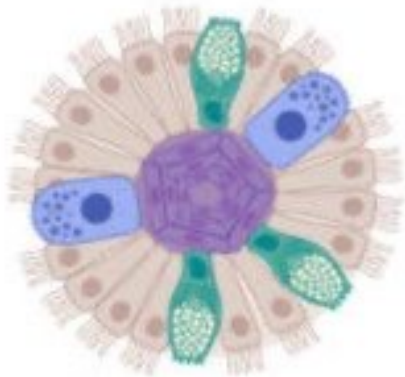




Organoids



Apical-inward

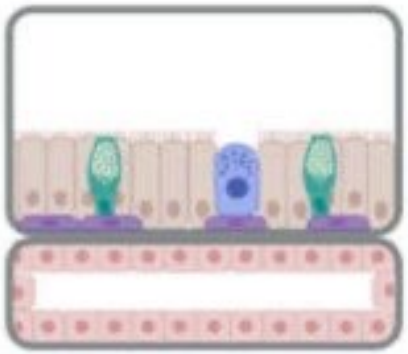


Apical-outward

Organ on a chip model

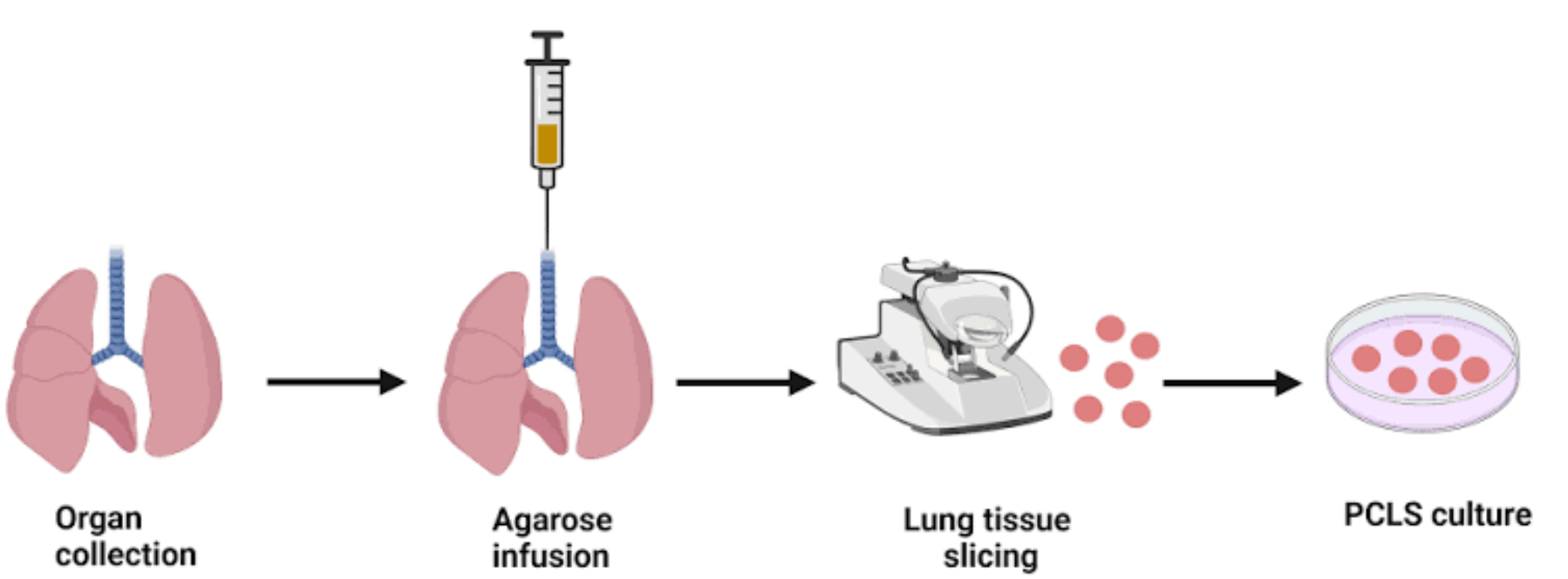


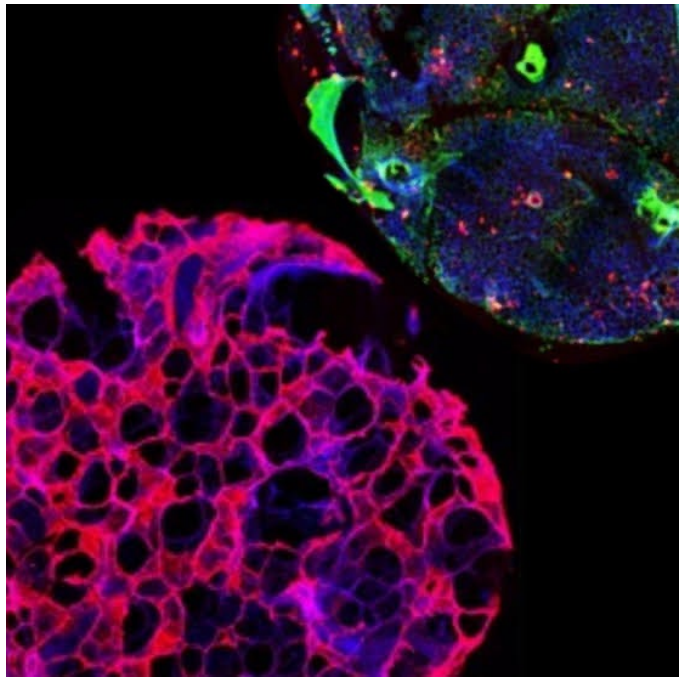
Top-view



Cross-section

PRECISION-CUT TISSUE SLICES





VANTAGGI: Mantengono parte dell'**architettura nativa** del tessuto e possono contenere le popolazioni cellulari originali, la ECM nativa, le componenti stromali, vascolari, immunitarie ecc.

SVANTAGGIO: hanno breve durata ☹

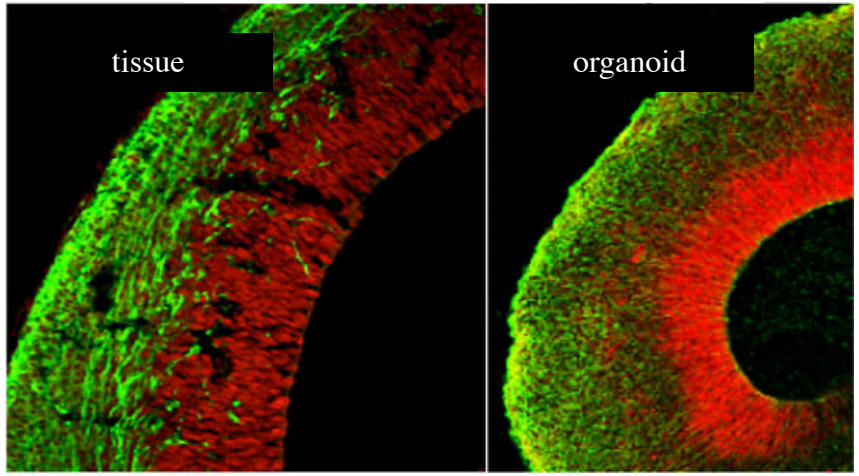
COLTURE ORGANOTIPICHE o ORGANOIDI

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 in presenza di fattori della nicchia staminale.

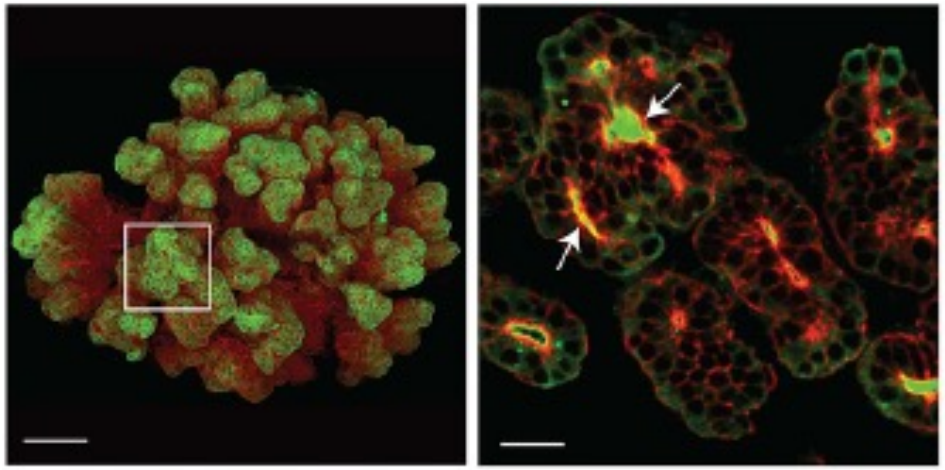
Ricapitolano l'organizzazione e le funzioni del corrispondente tessuto/organo.

Brain

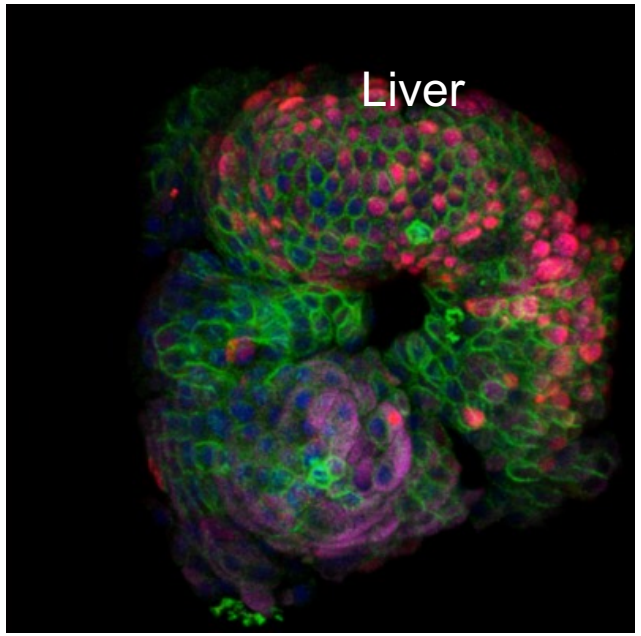


Repic & Lancaster , Plos Blogs 2013

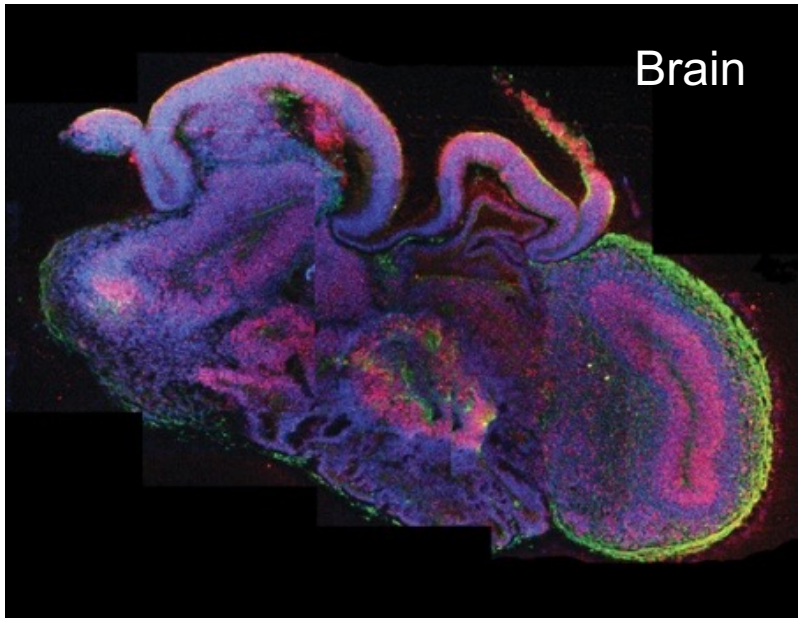
Mammary gland

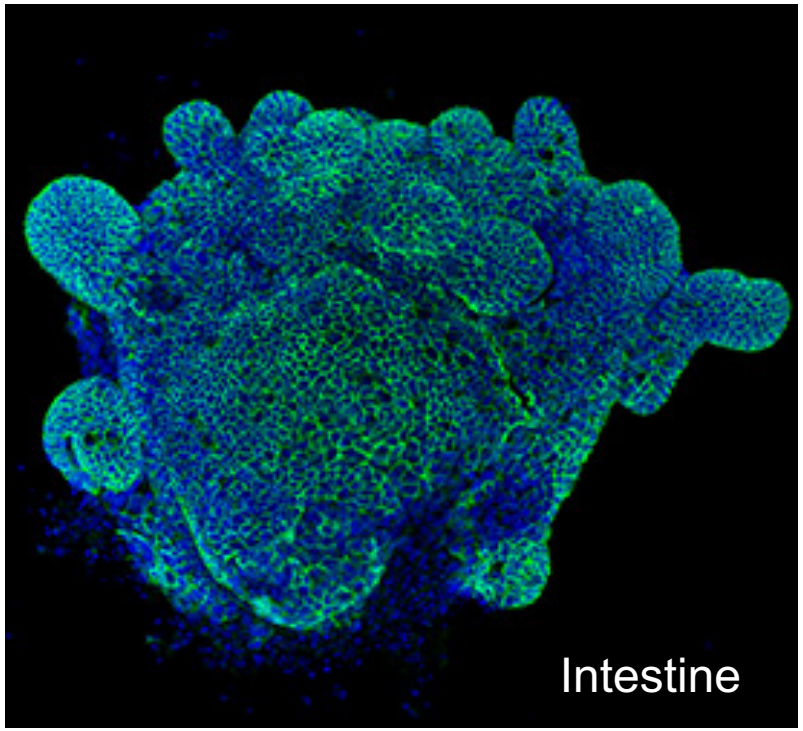


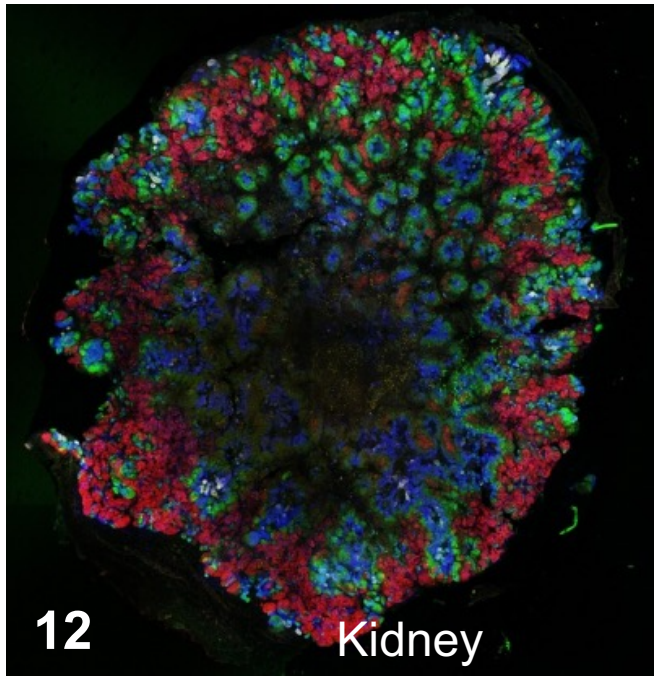
Jamieson et al., Development 2017

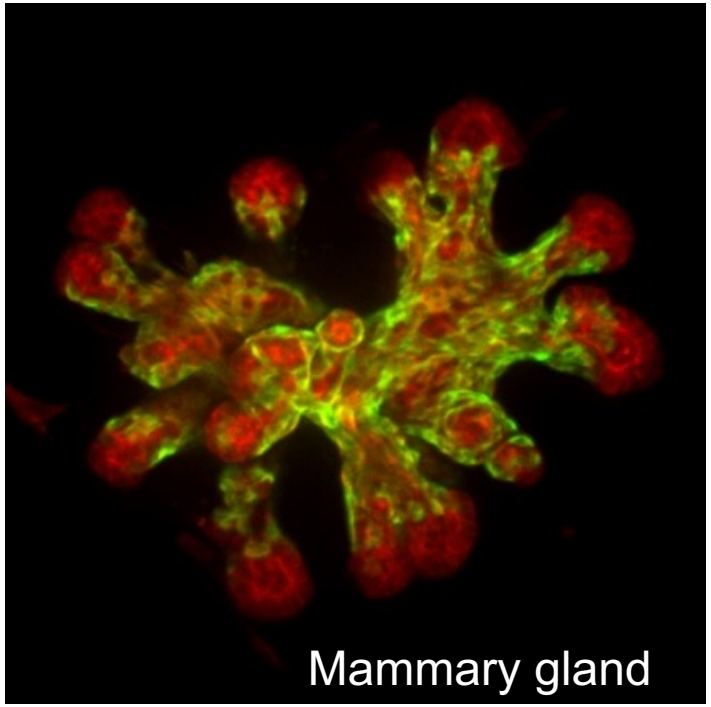


Presentano microanatomia realistica e specializzazione funzionale









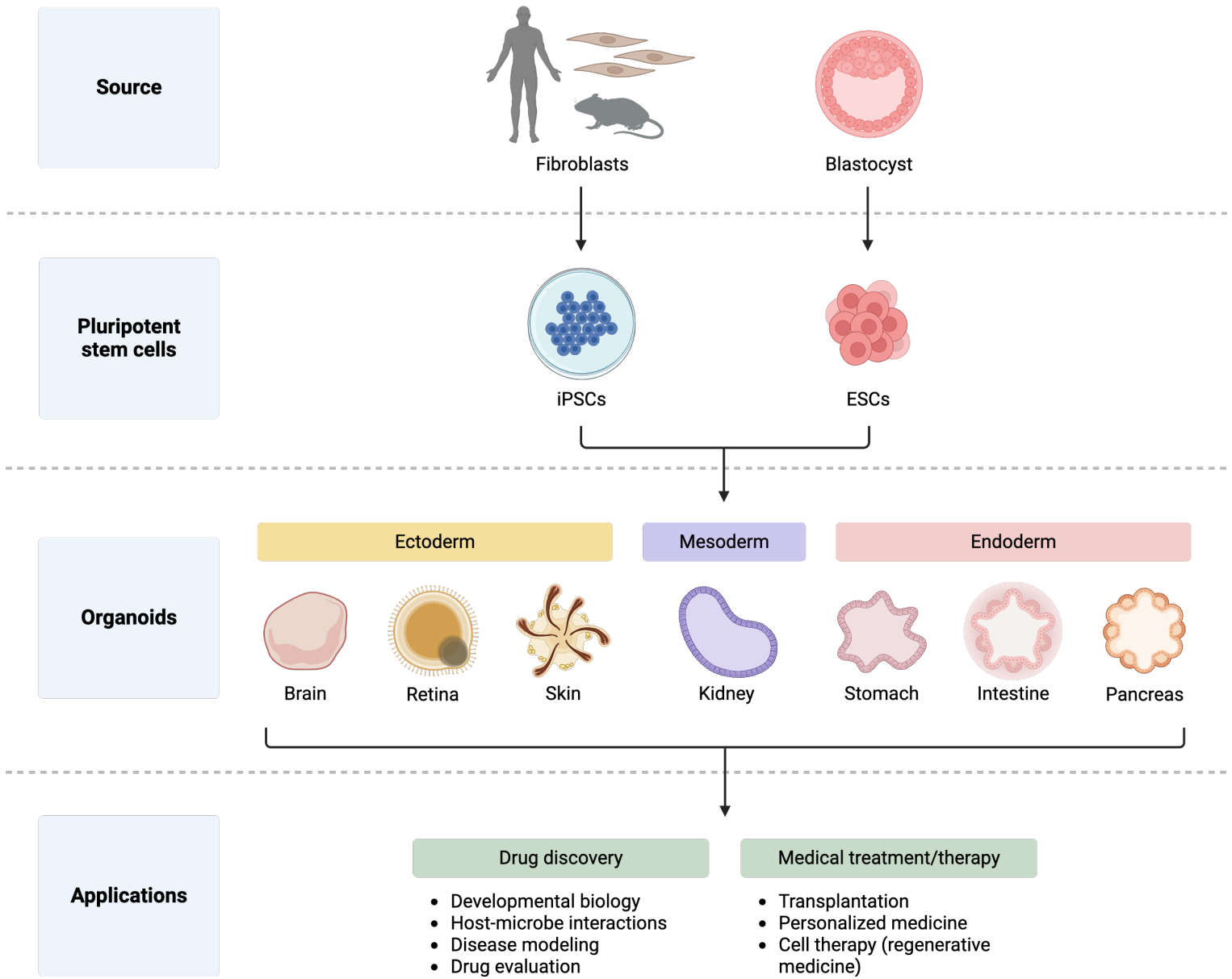
Generazione di ORGANOIDI

Gli organoidi possono essere derivati da 2 TIPI DI SCs

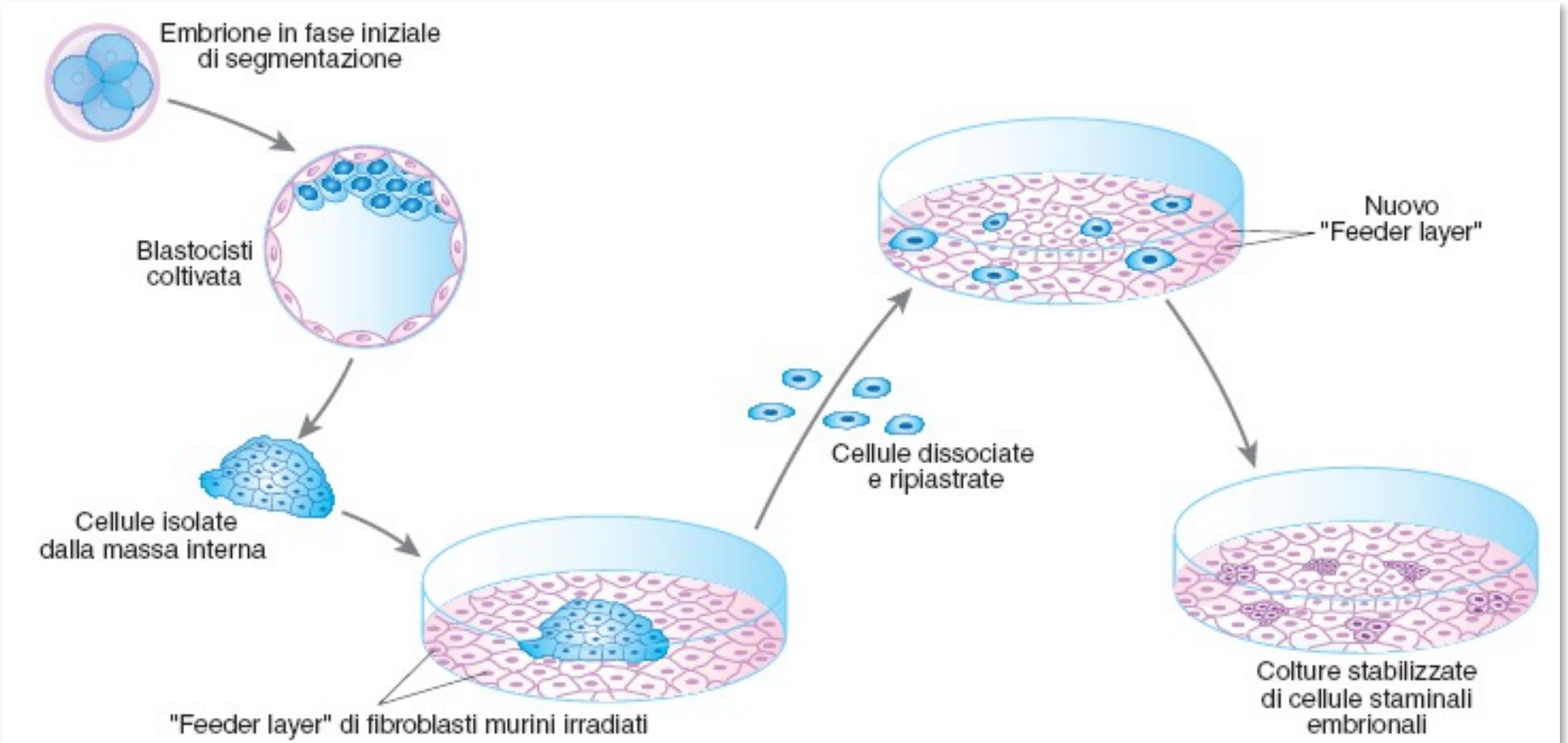
a) Cellule staminali pluripotenti (embryonic stem cells ESCs o induced pluripotent SCs iPSCs)

b) Cellule staminali adulte tessuto-specifiche (ASCs)

ORGANOIDI da cellule staminali pluripotenti

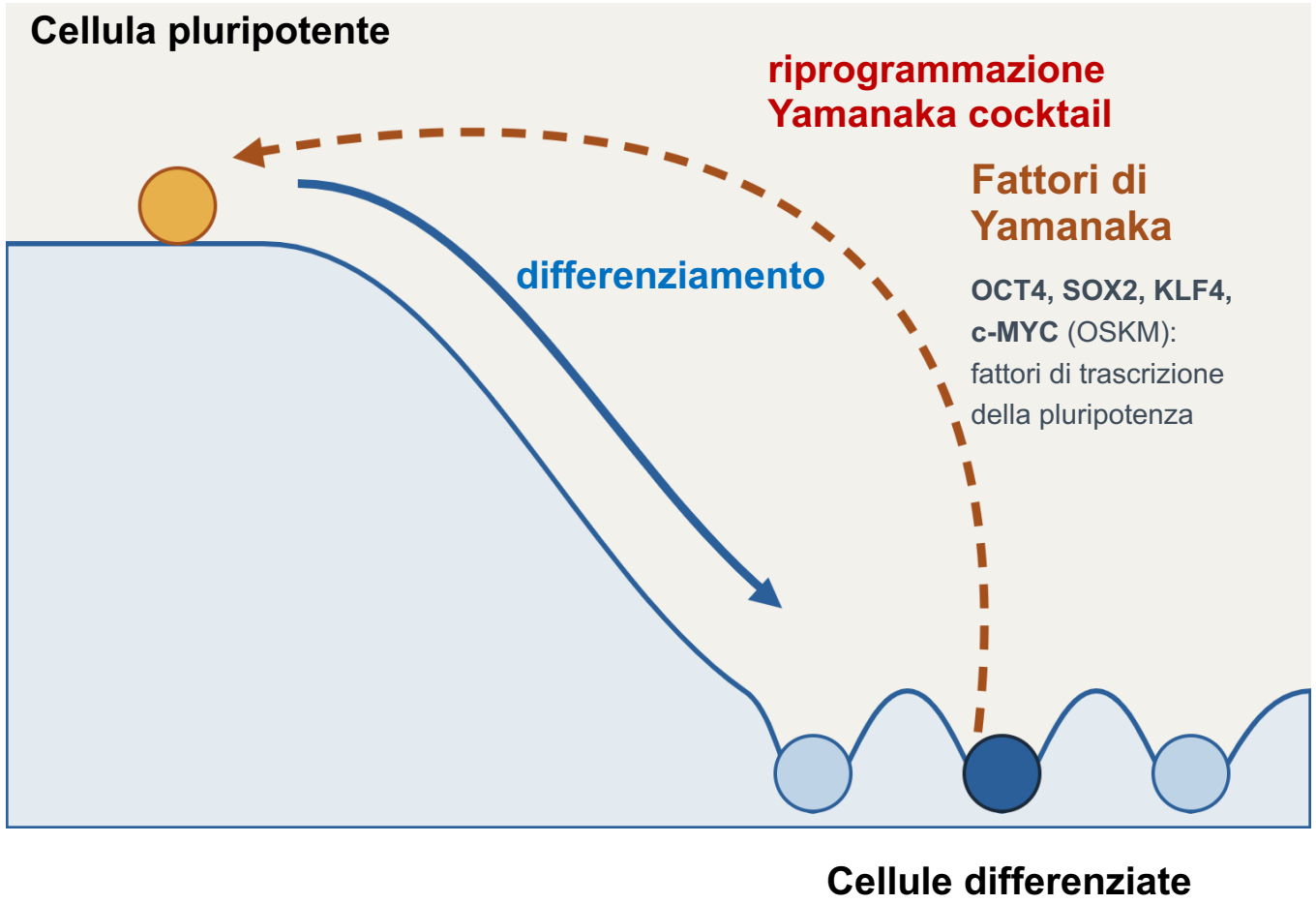


Cellule staminali EMBRIONALI (ES)



♦ **FIGURA 18.2**
Generazione di cellule staminali embrionali (cellule ES) dalla blastocisti.

Cellule pluripotenti indotte (iPSCs)



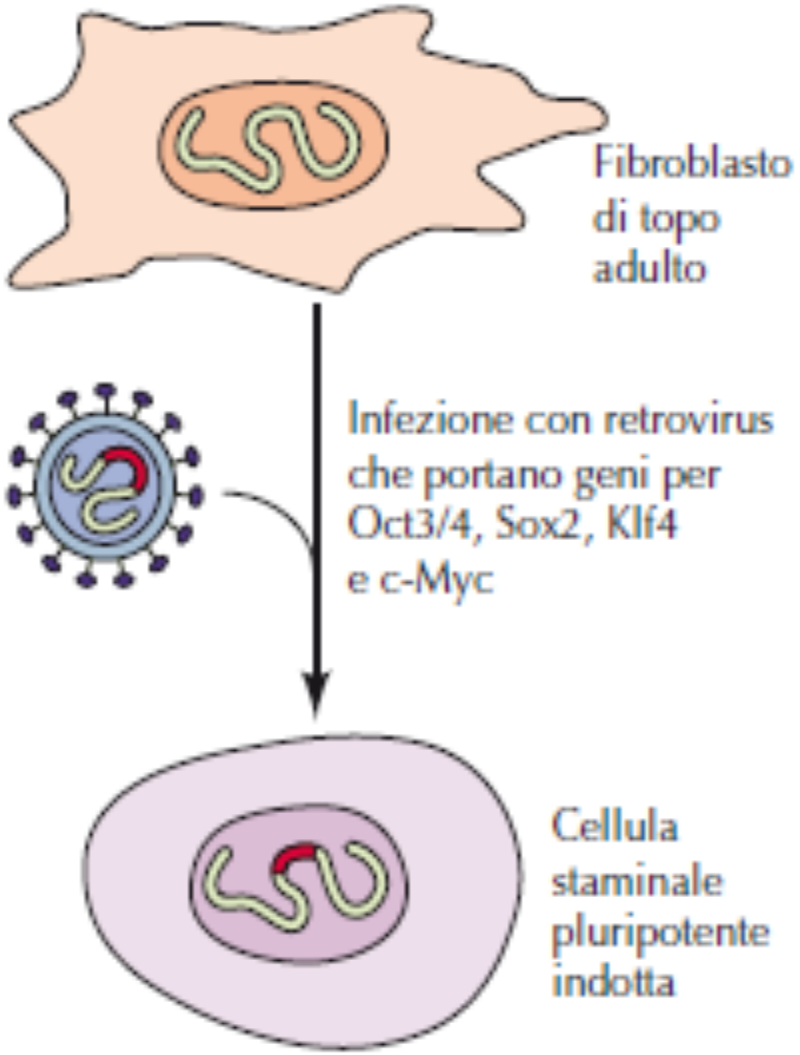
Durante il differenziamento una cellula si specializza a poco a poco: da pluripotente diventa fibroblasto, neurone, epatocita.
Per decenni si è pensato che questo percorso fosse **a senso unico**.

Eppure un fibroblasto contiene **gli stessi geni** di una cellula embrionale.
Ciò che cambia è quali geni sono accesi e quali spenti: lo **stato epigenetico**.

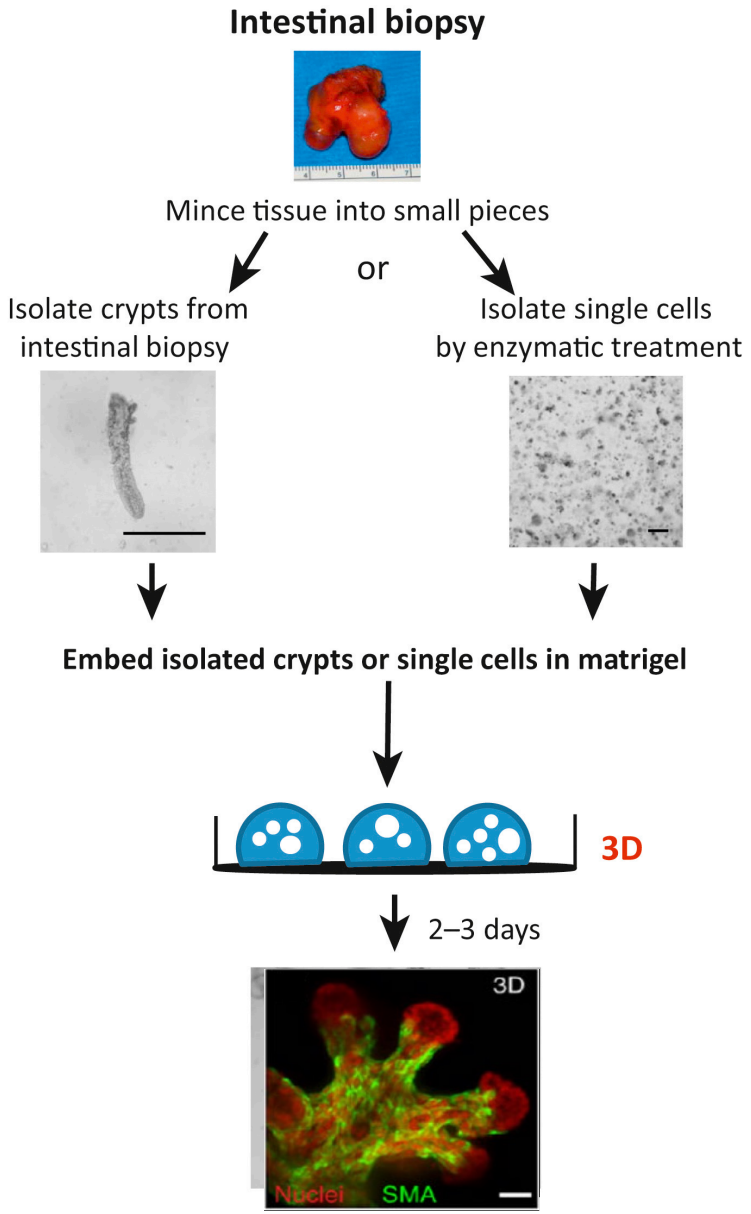
Nel 2006 **Yamanaka** ha mostrato che bastano **quattro fattori di trascrizione** per riattivare il programma embrionale e riportare una cellula adulta allo stato pluripotente, attraverso modifiche epigenetiche.

Cellule pluripotenti indotte (iPSCs)

- **2006:** prime iPSC da fibroblasti di topo (Takahashi e Yamanaka)
- **2007:** iPSC umane (Yamanaka; Thomson con OCT4, SOX2, NANOG, LIN28)
- **2012:** Nobel per la Medicina a Yamanaka e Gurdon



generazione di ORGANOIDI da TESSUTI ADULTI – cellule staminali adulte (ASCs)



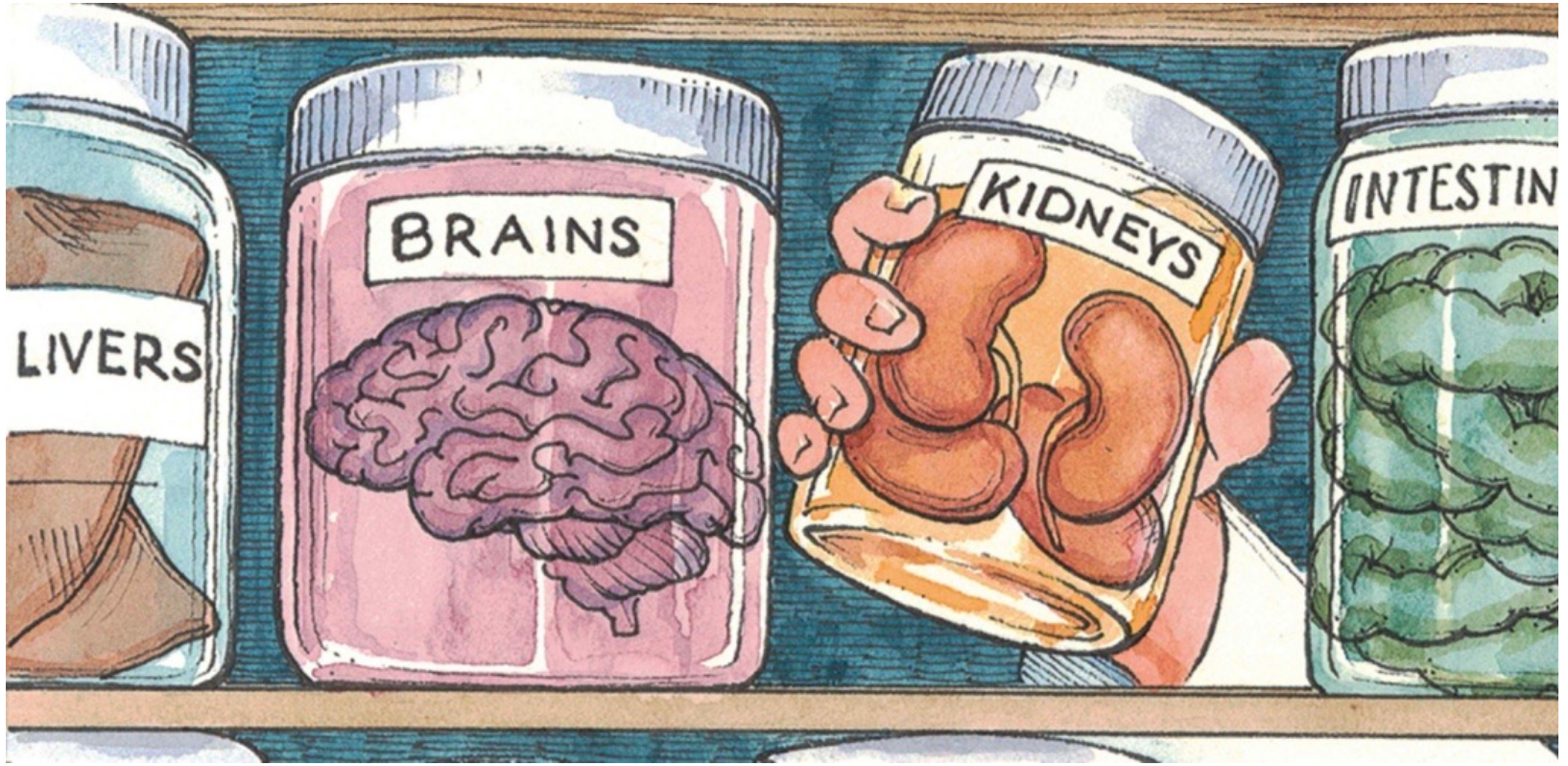
MATERIALE DI ORIGINE:

-ASCs purificate

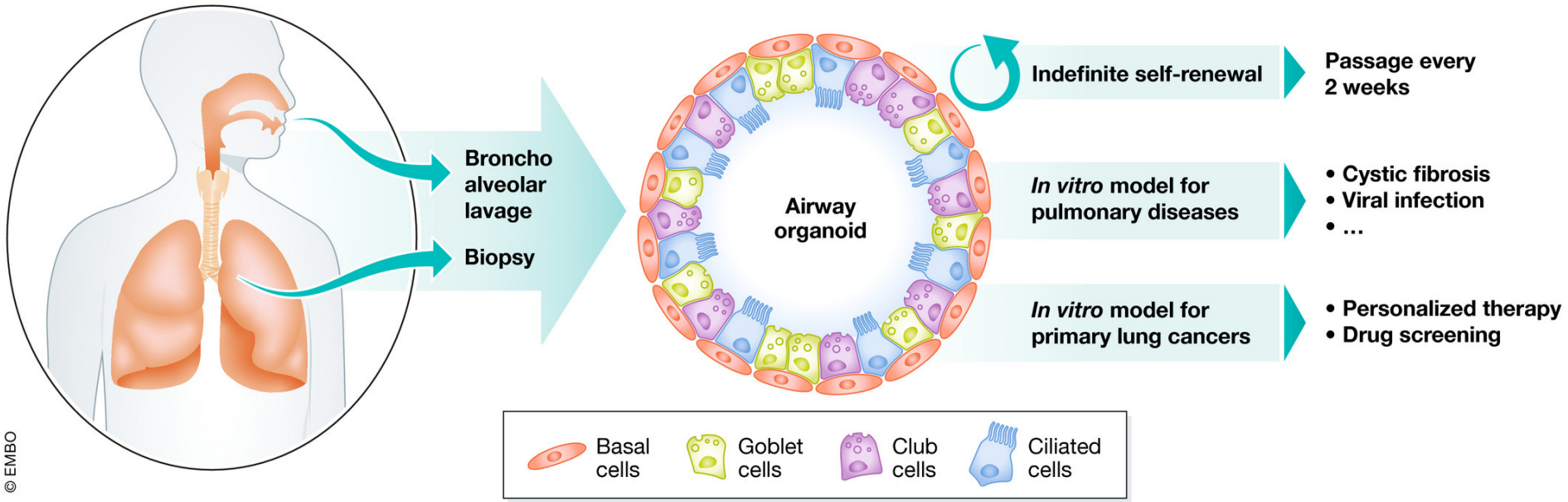
-Porzioni di tessuto contenenti ASCs (in alcuni casi le ASCs necessitano di cellule di supporto per la crescita)

https://vimeo.com/222833601

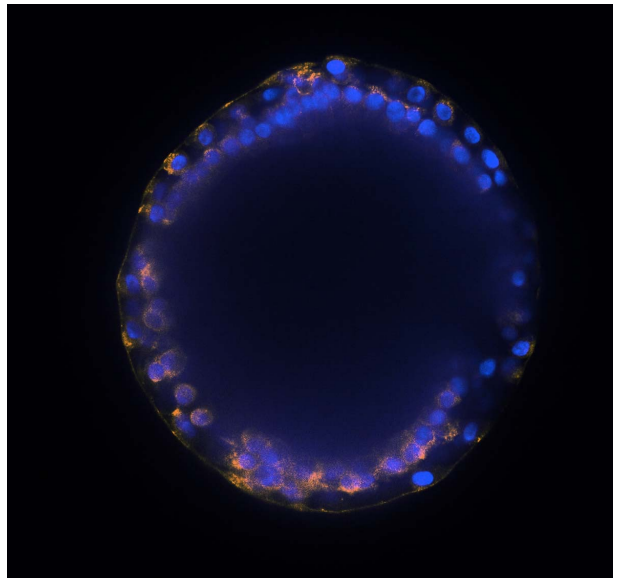
Biobanche di organoidi da donatori sani o da pazienti per lo studio di patologie umane e risposta ai farmaci



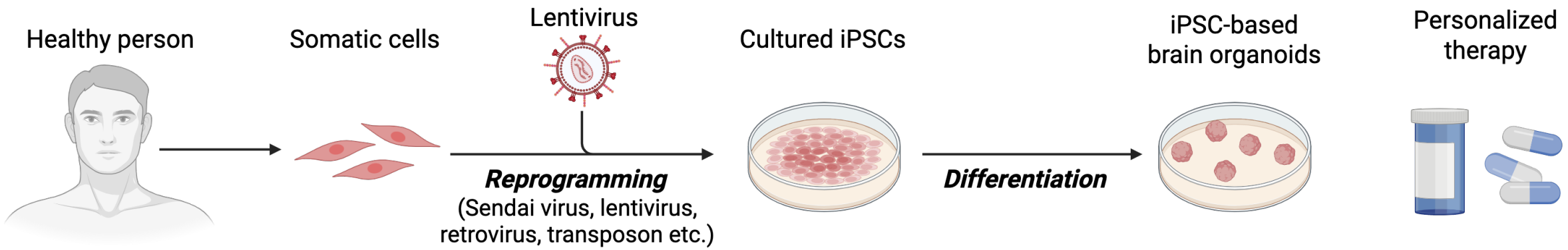
Van de Wetering et al., Cell 2015


Broncho alveolar lavage
Biopsy
Airway organoid
Indefinite self-renewal
Passage every 2 weeks
In vitro model for pulmonary diseases
• Cystic fibrosis
• Viral infection
• ...
In vitro model for primary lung cancers
• Personalized therapy
• Drug screening
Basal cells
Goblet cells
Club cells
Ciliated cells

© EMBO



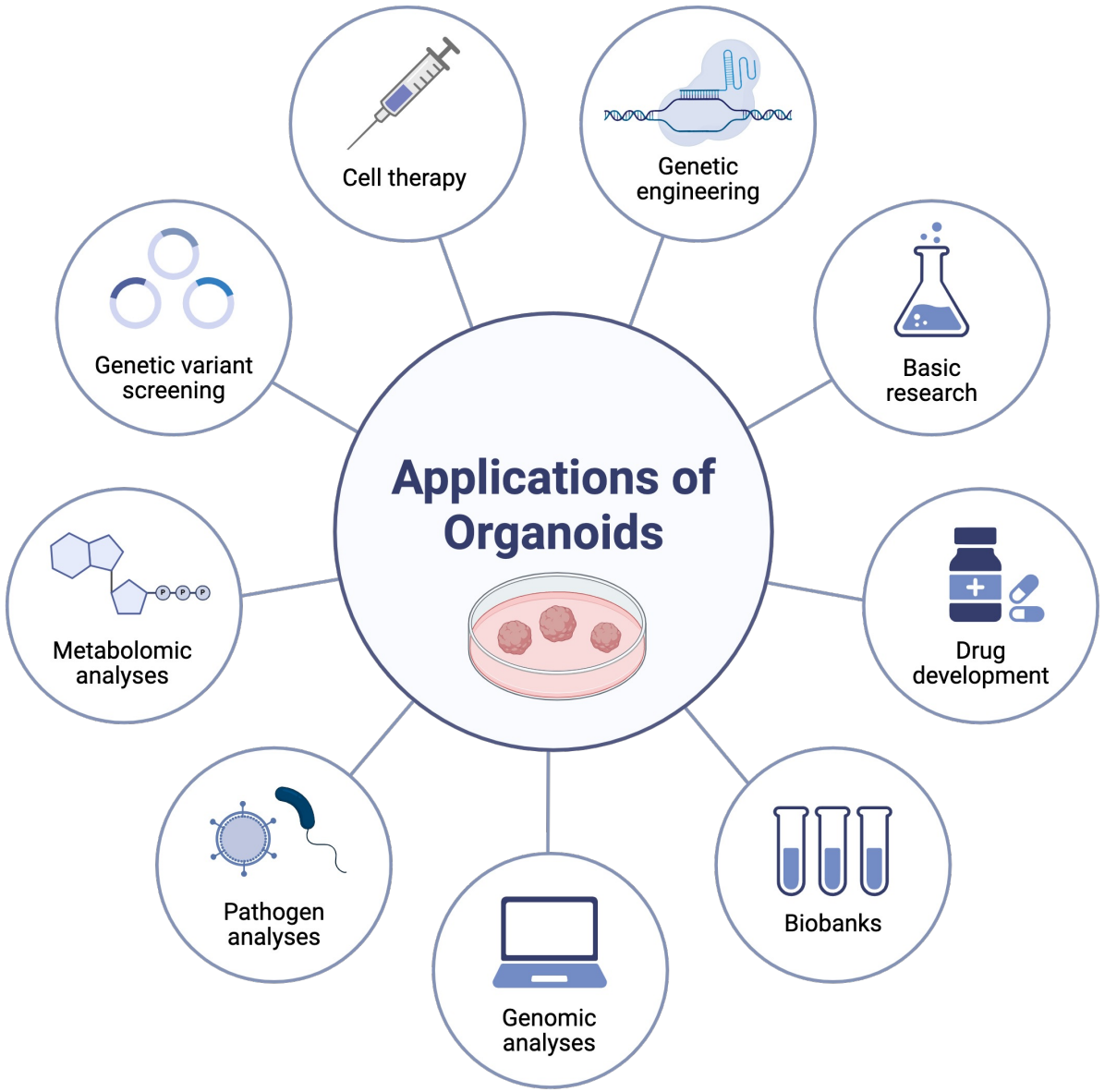
iPSCs da paziente come modelli di patologie



Vantaggi: cellule geneticamente identiche al paziente.

Efficienza bassa: in genere meno dell'1% delle cellule si riprogramma

Applicazioni degli organoidi in biomedicina



ESPERIENZA #3:
COLTURE 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

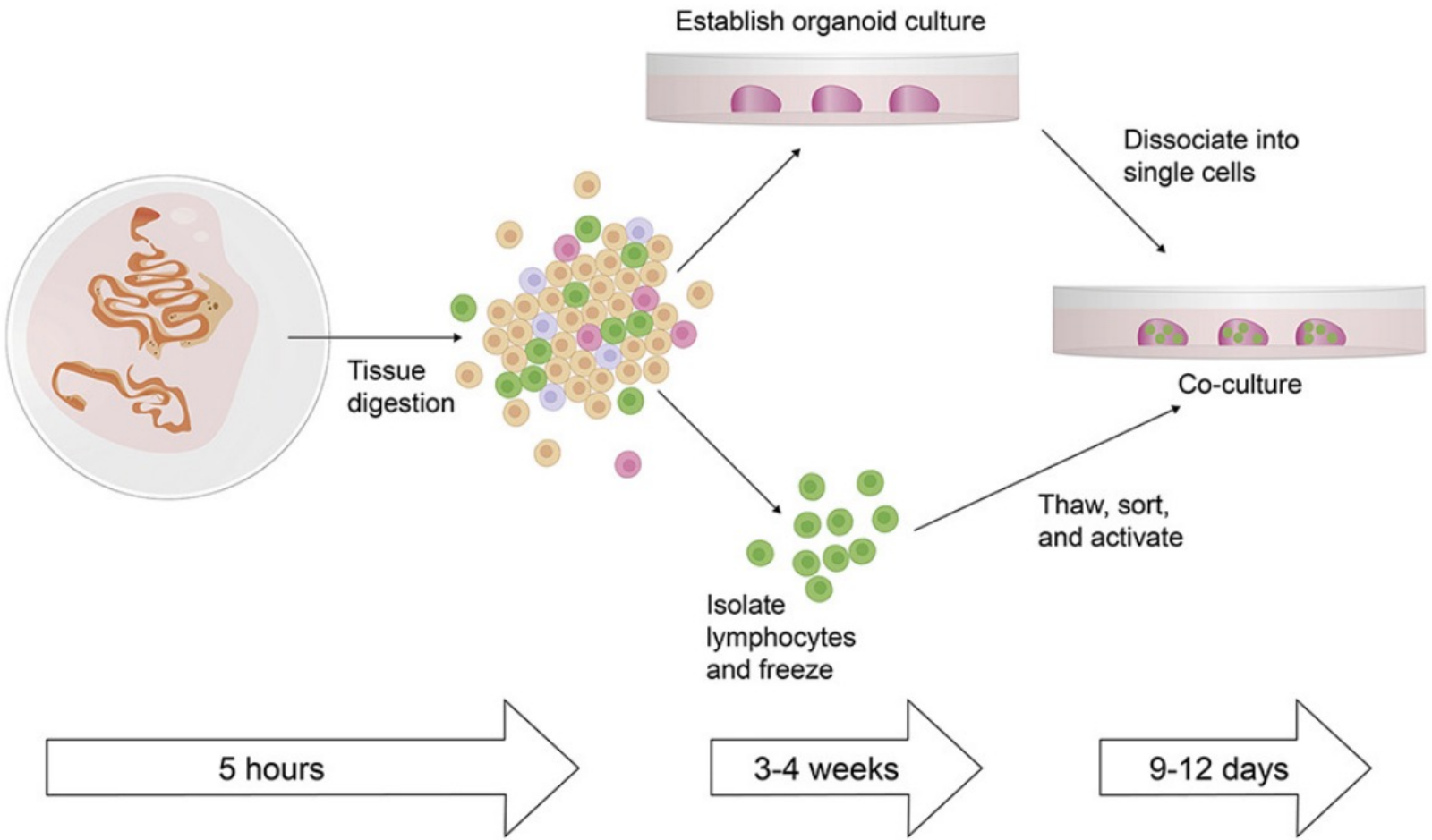
Medium:
- Specific growth factors (niche): e.g. FGF, EGF, activators of WNT and NOTCH pathway



	HuBiogel[1M1]	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



Co-coltura di diversi tipi cellulari (Es. Sistema immunitario, stroma…)



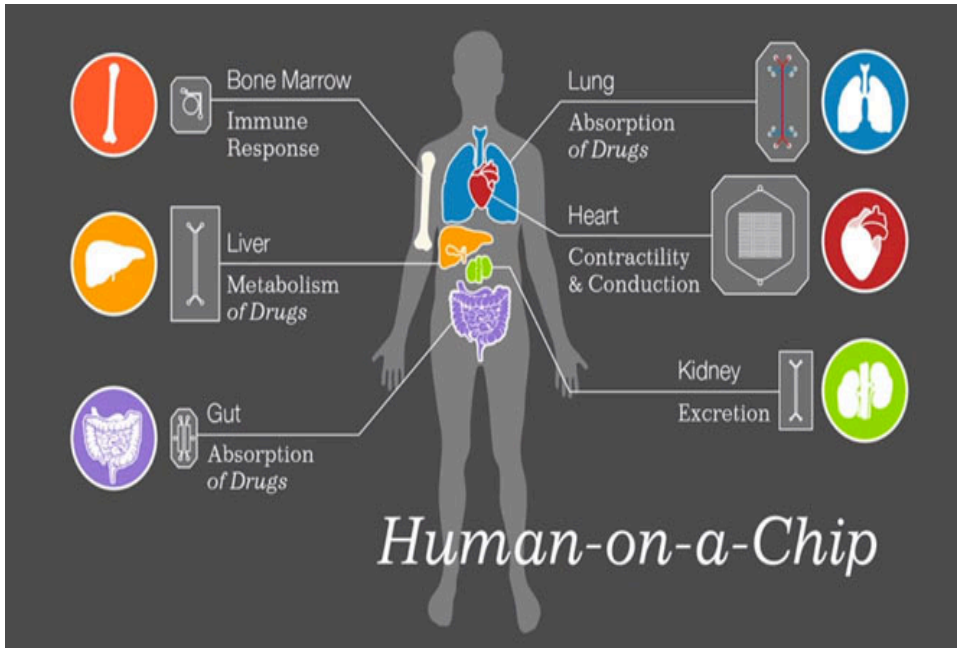
Organ-on chip, human-on-chip

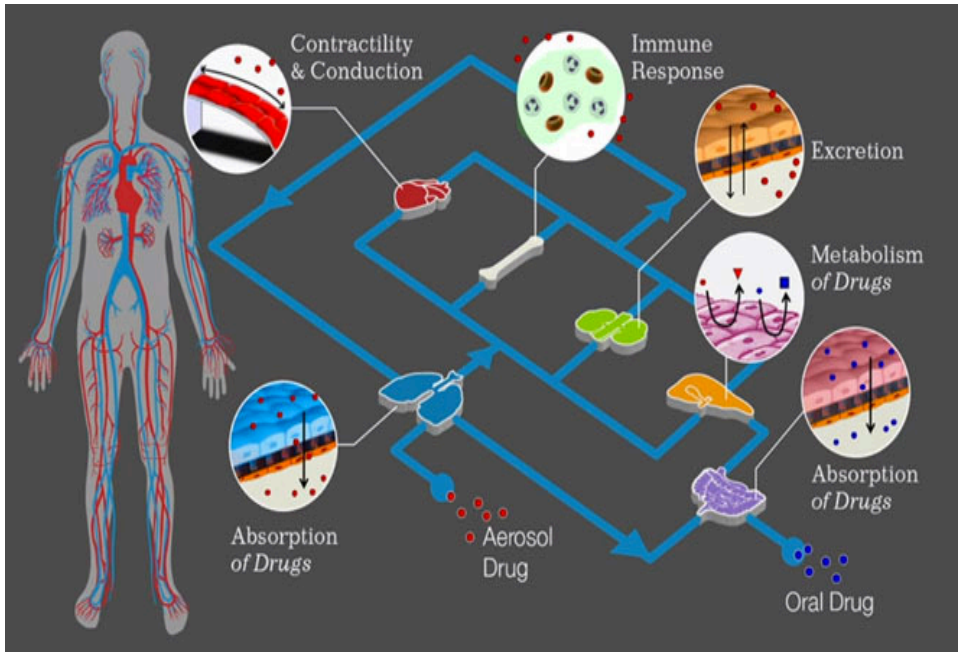
Dispositivi microfluidici

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



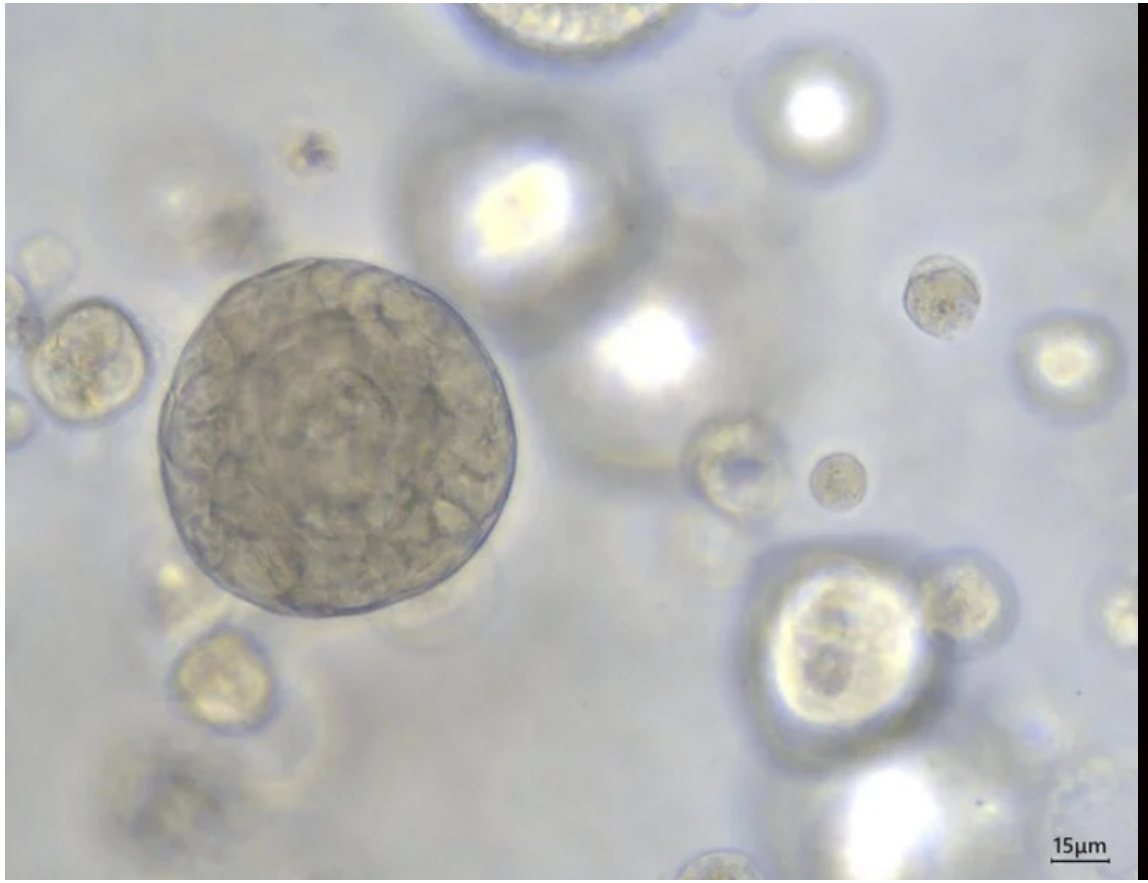


Osservazione di campioni 3D

Microscopio	Cosa offre	Quando si usa
Rovesciato (campo chiaro-brightfield, contrasto di fase)	Osservazione rapida a basso ingrandimento (4–10×), senza colorazione	Controllo di crescita, forma e dimensioni
Stereomicroscopio	Visione tridimensionale	Manipolazione di organoidi
Epifluorescenza (widefield)	Fluorescenza di tutto lo spessore NB: la luce fuori fuoco rende l'immagine sfocata	Reporter fluorescenti (es. GFP), saggi di vitalità live/dead
Confocale (a scansione o spinning disk)	Sezioni ottiche z-stack per la ricostruzione 3D	Immunofluorescenza whole-mount; live imaging con spinning disk
Multiphoton	Elevata penetrazione, poco fototossica	Organoidi grandi osservati in profondità, anche live
Light-sheet	Illumina solo il piano a fuoco: acquisizione veloce, poco fototossica	Time-lapse
Elettronico (TEM, SEM)	Risoluzione nanometrica, solo su campioni fissati	Ultrastruttura (es. giunzioni cellulari)

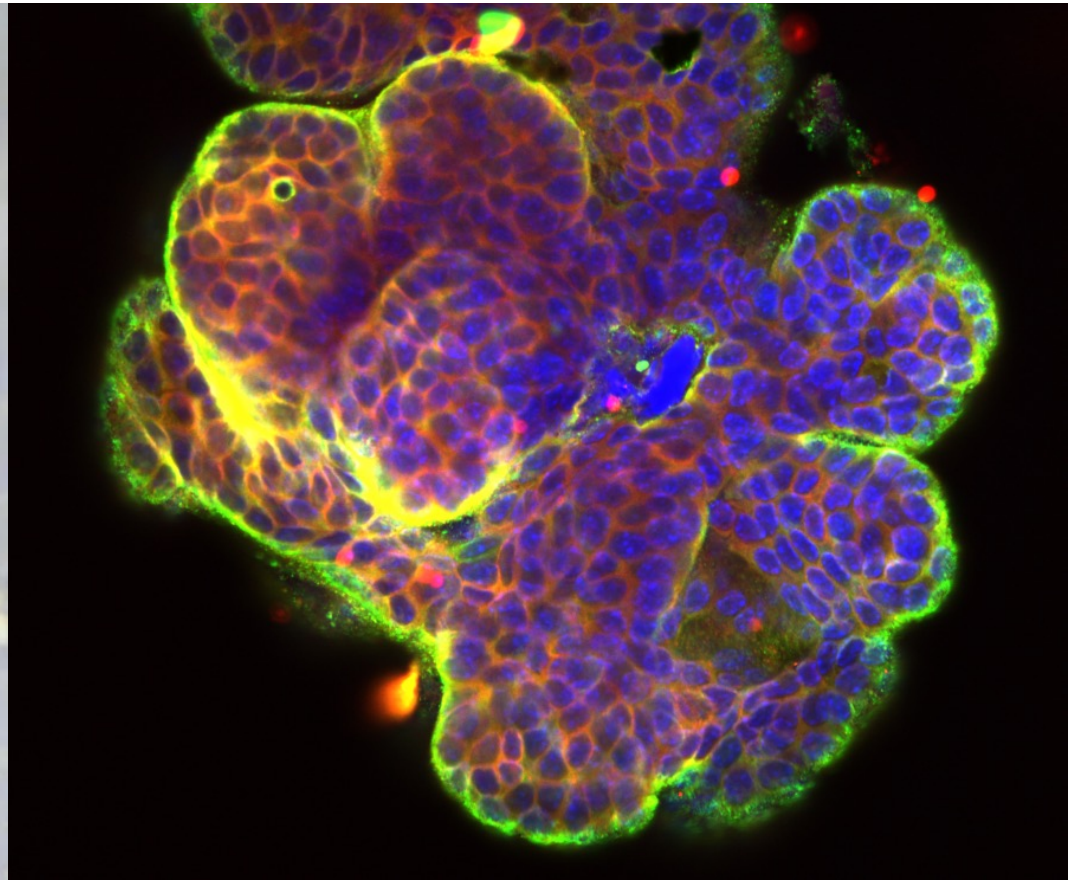
Osservazione di campioni 3D

Immagine al microscopio rovesciato a campo chiaro



Human esophageal squamous carcinoma organoid; scale bar 15µm.

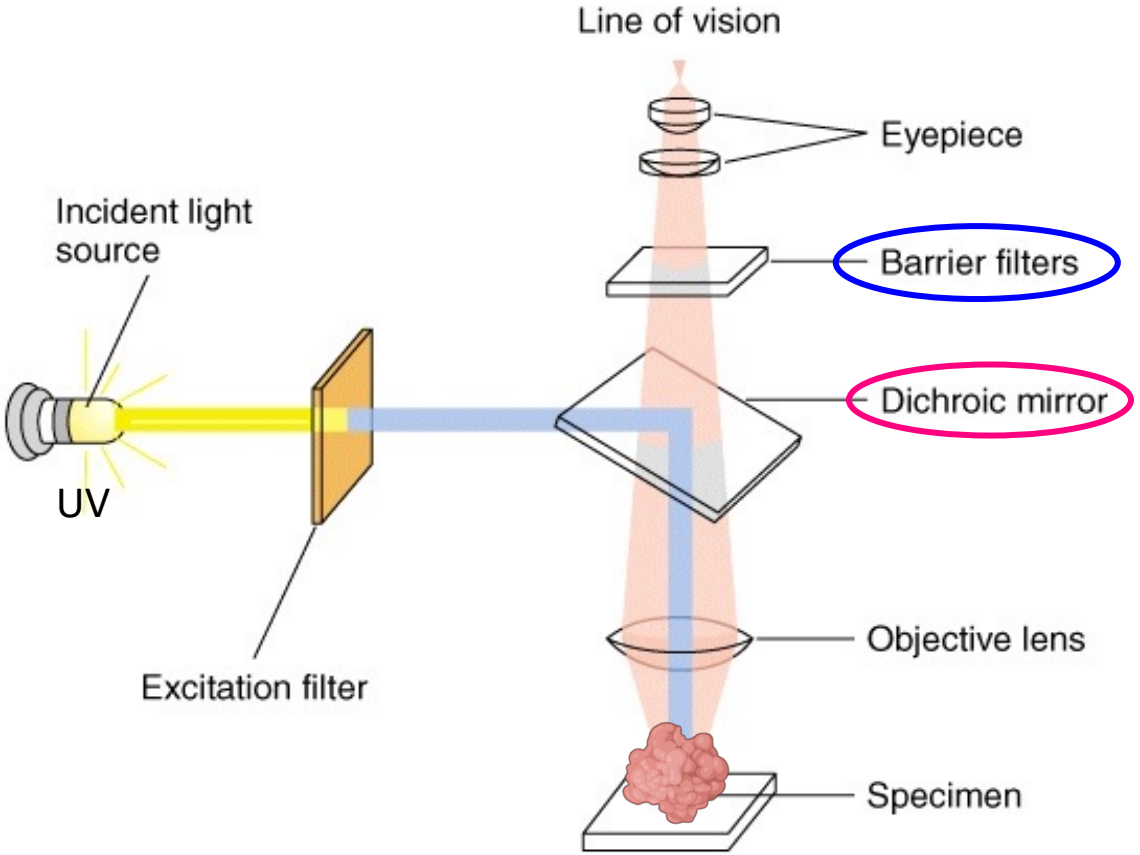
Immagine al microscopio a fluorescenza confocale



Nuclei (DAPI)
CK 14 - FITC
CK 18 - RITC

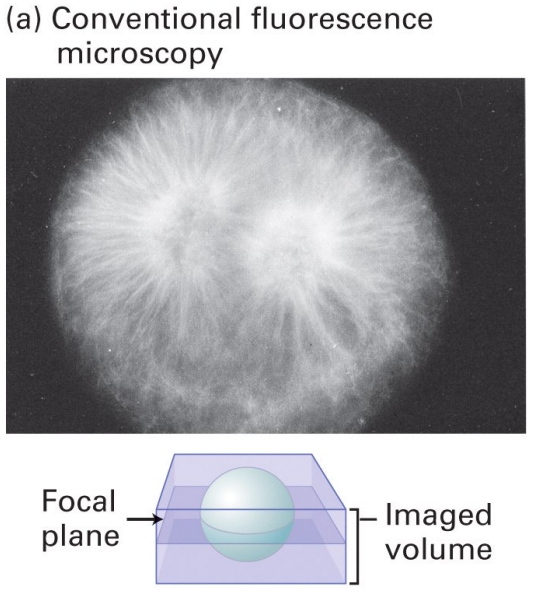
Mouse mammary carcinoma organoid

In un campione spesso ogni piano emette fluorescenza. Con il microscopio a epifluorescenza widefield l'osservatore riceve la luce emessa dalle molecole che stanno nel piano focale, ma anche da quelle sopra e sotto il piano focale.



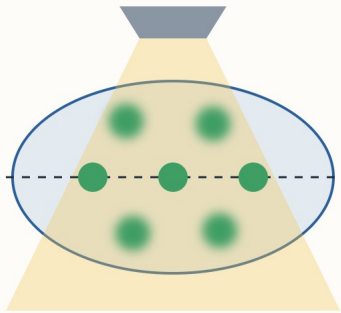
Campione 3D colorato con sostanze fluorescenti





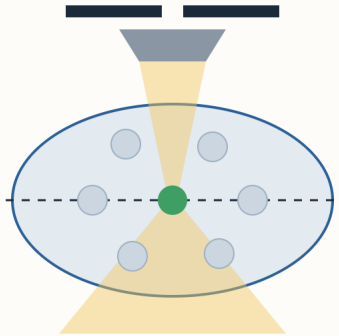
Osservazione di campioni 3D: isolare un piano alla volta

In un campione spesso ogni piano emette fluorescenza. Per vedere in tre dimensioni bisogna raccogliere la luce di un solo piano alla volta: varie tecniche lo fanno in modo diverso.



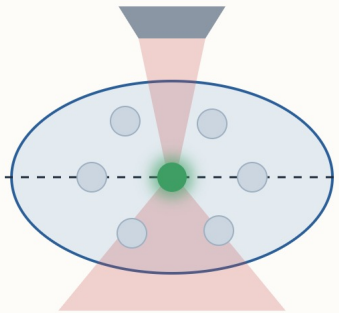
Epifluorescenza

Tutto lo spessore emette luce: i piani fuori fuoco sfocano l'immagine.



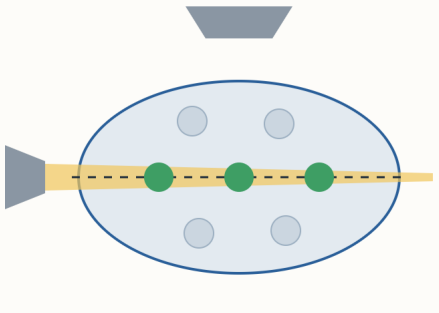
Confocale scarta

Un pinhole blocca la luce che arriva da fuori fuoco.



Multiphoton non genera

La luce infrarossa eccita solo nel punto focale: fuori fuoco la fluorescenza non nasce.



Lightsheet non illumina

Una lama di luce laterale illumina solo il piano osservato.

Luce di eccitazione Fluorescenza raccolta Piano focale

Sezioni ottiche in serie (z-stack) → ricostruzione 3D dell'organoide, senza doverlo tagliare.

Microscopio a fluorescenza confocale

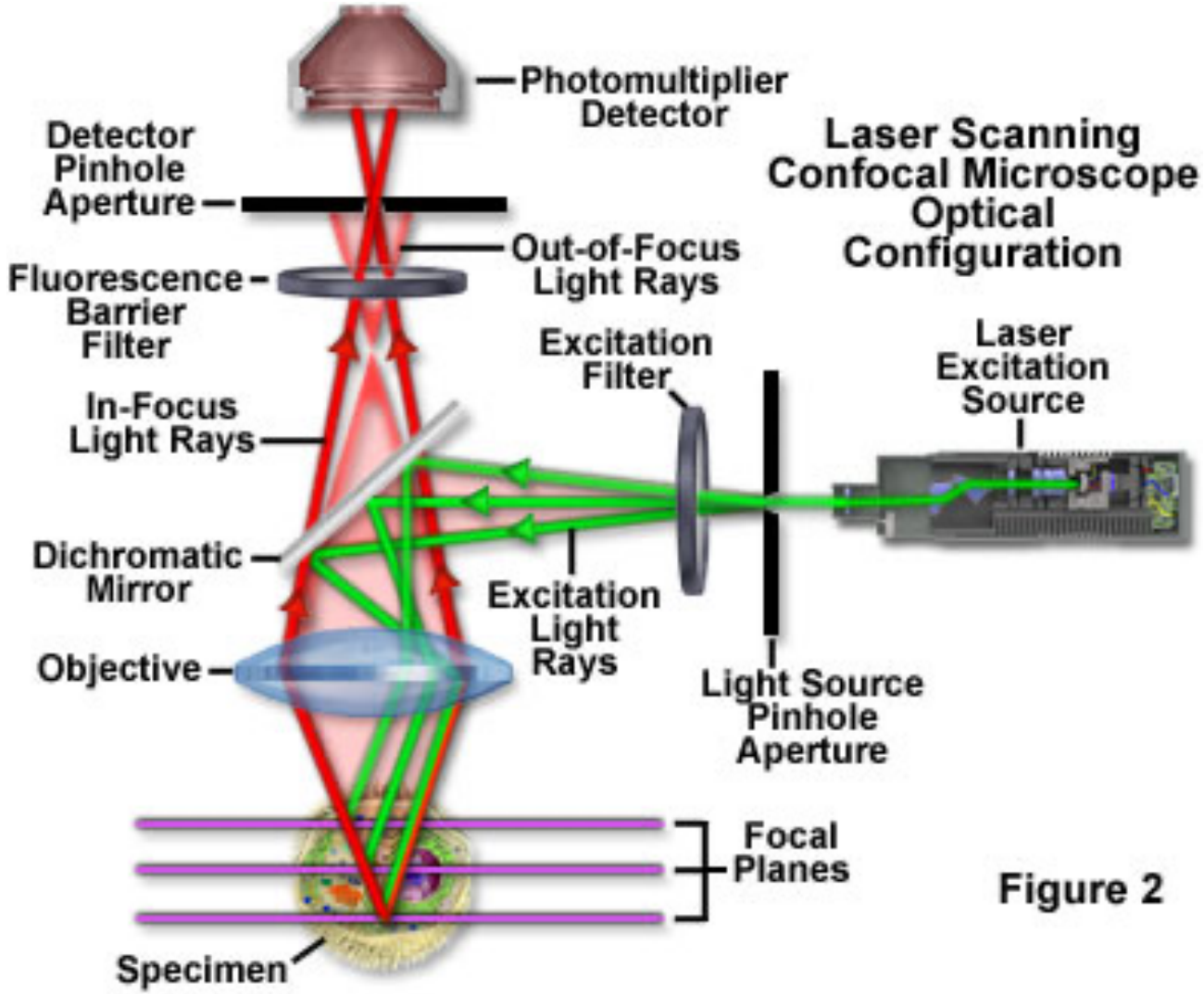
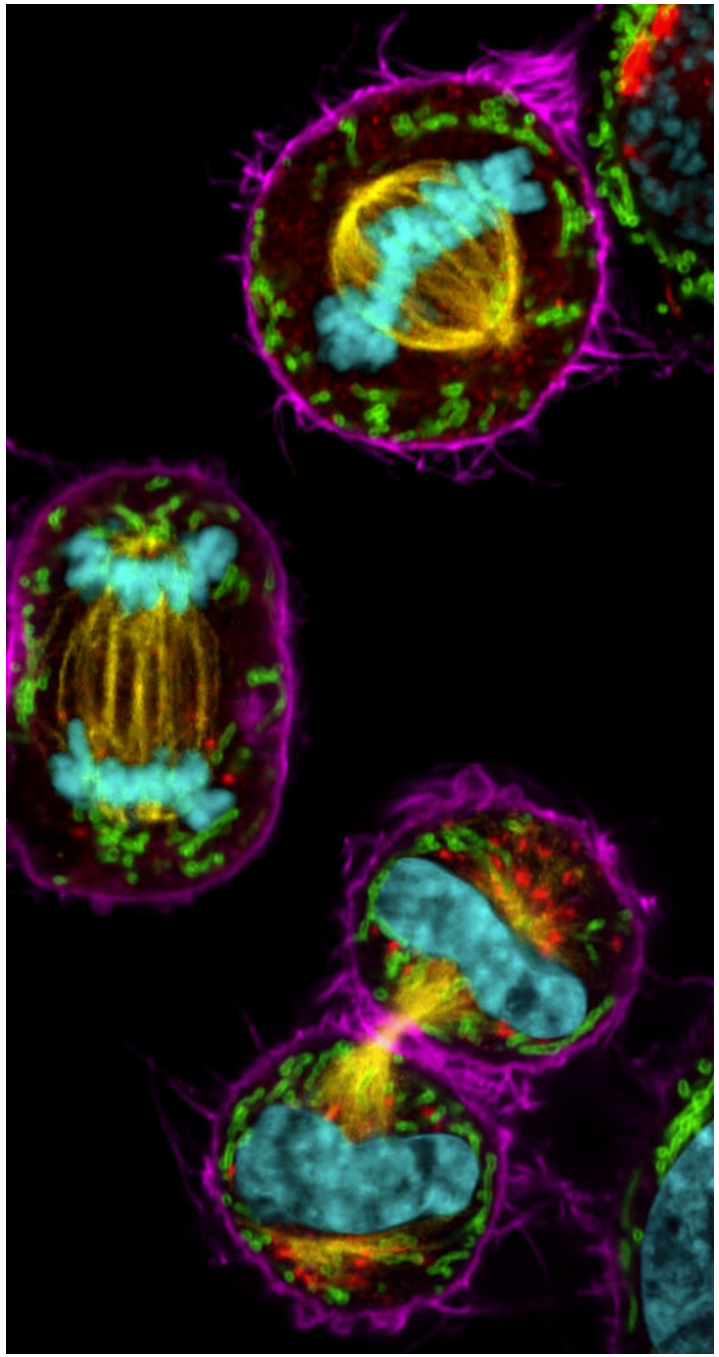
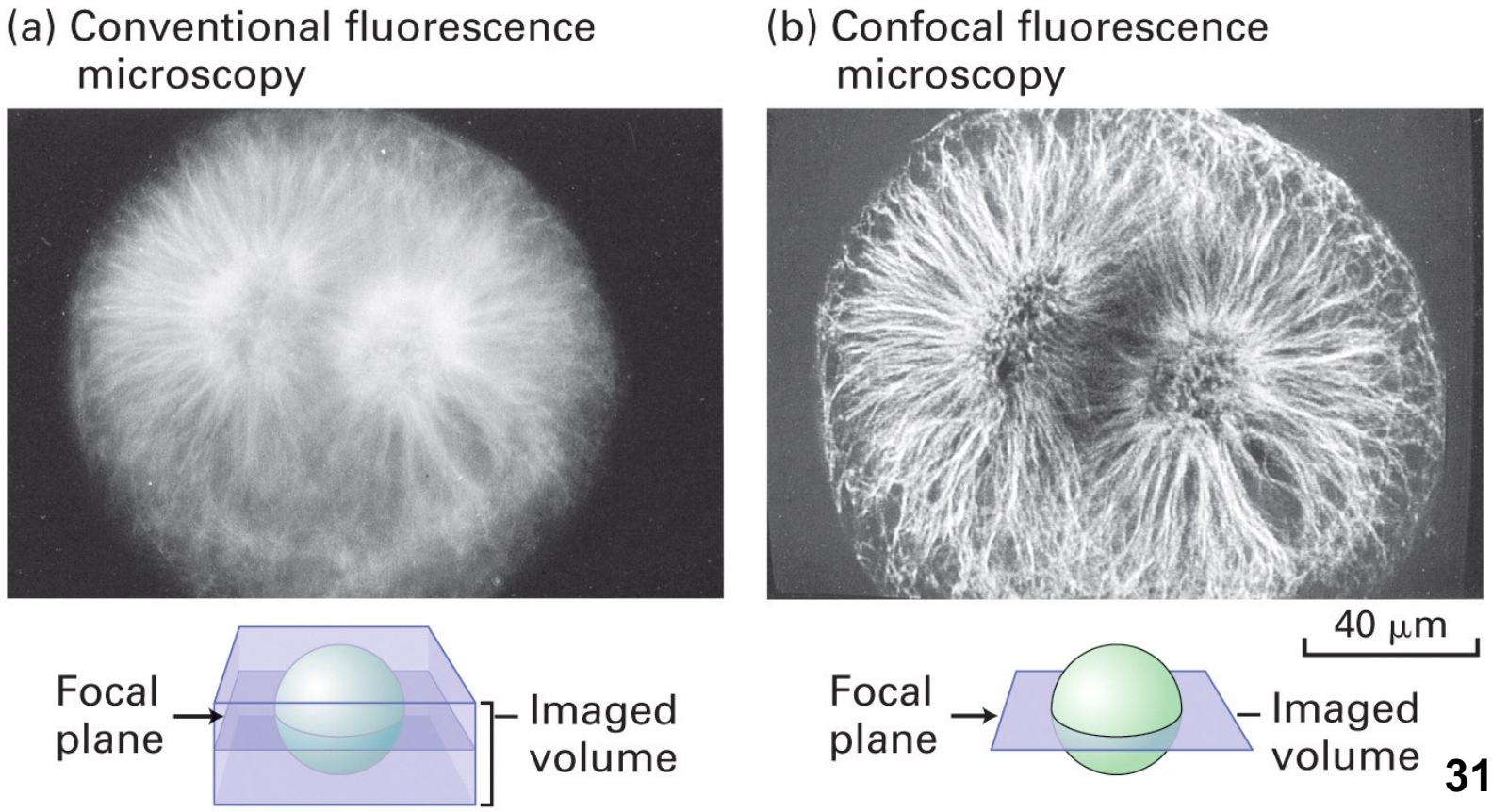


Figure 2



MICROSCOPIA A FLUORESCENZA CONFOCALE

Con un microscopio a fluorescenza confocale solo la luce emessa dal campione che proviene dal PIANO FOCALE viene utilizzata per formare l'immagine = sezione confocale

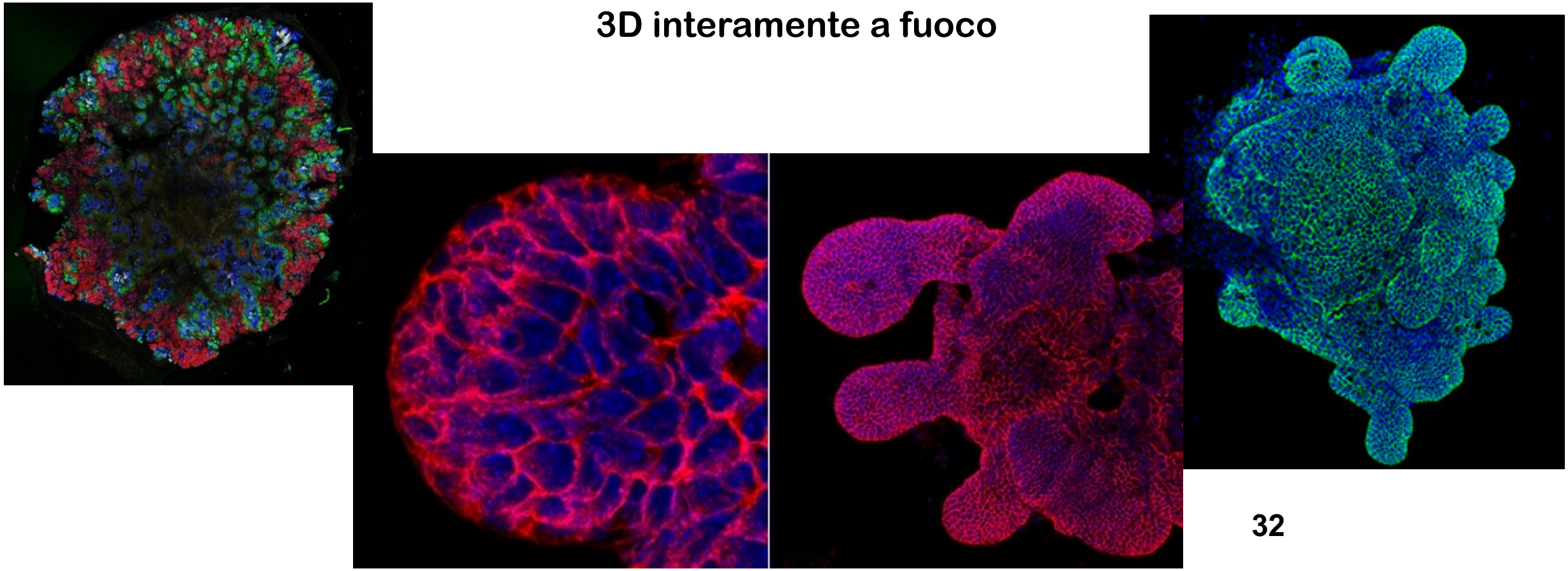


Ottenimento di immagini 3D

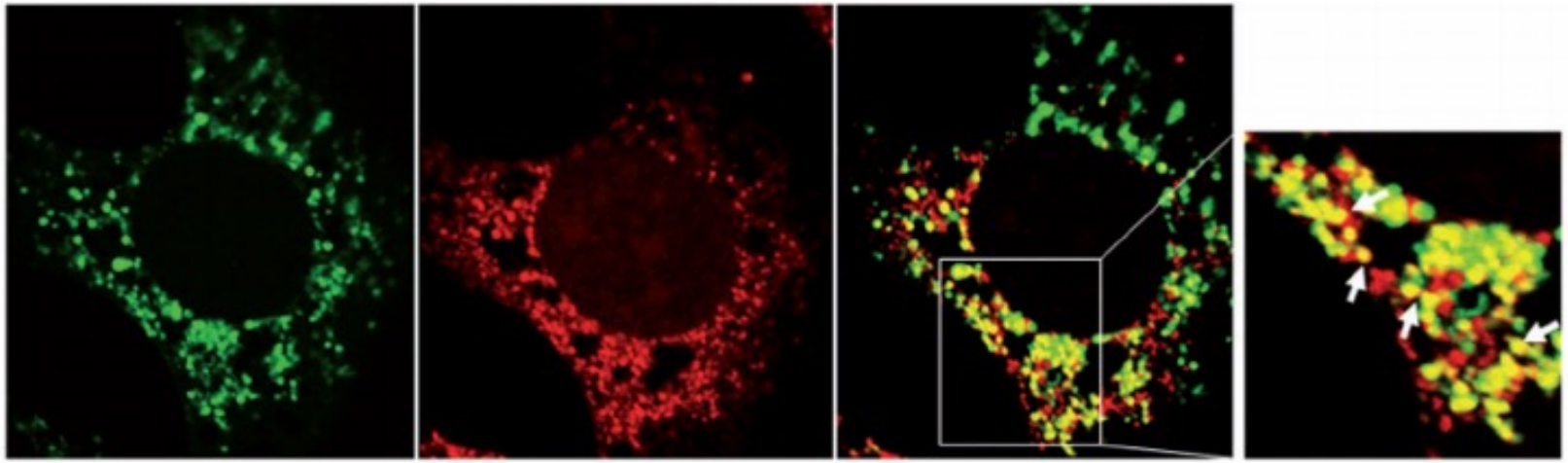
mediante microscopia confocale:

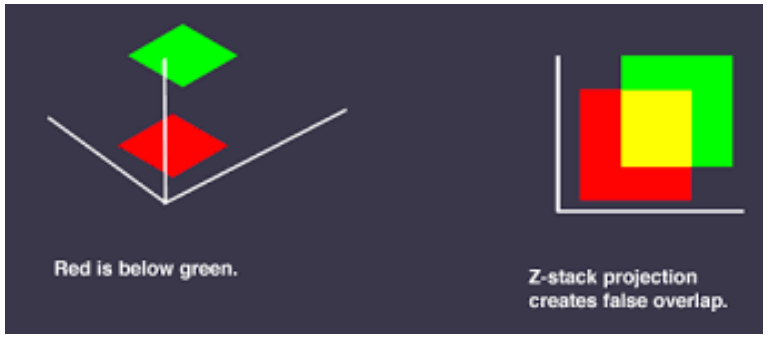
diverse sezioni ottiche confocali del campione (Z-stack)

vengono utilizzate da un algoritmo che ricostruisce un'imagine 3D interamente a fuoco



Utilizzo della microscopia confocale per analizzare la colocalizzazione di segnali in un campione





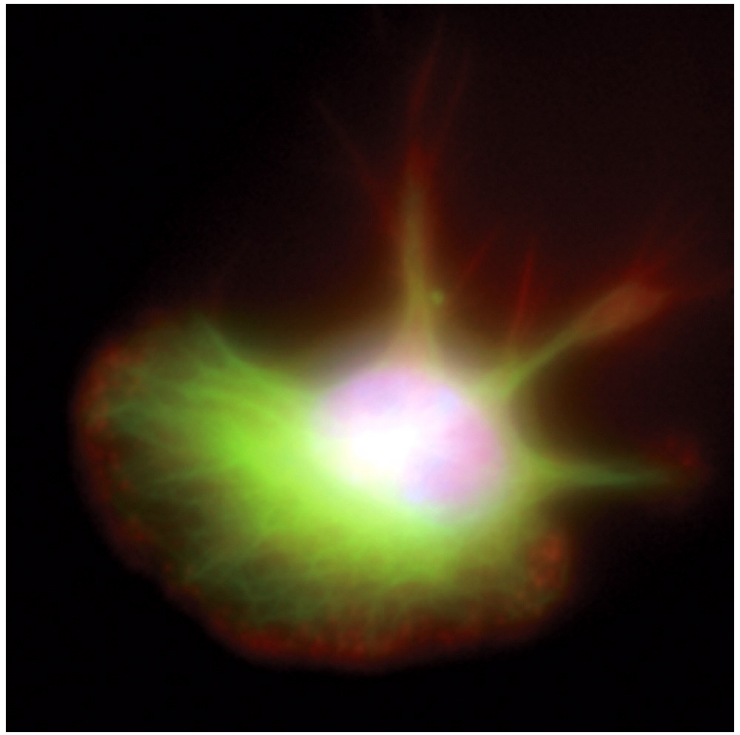
Se 2 o più segnali colocalizzati sono confocali, le molecole possono essere considerate co-localizzate nel campione

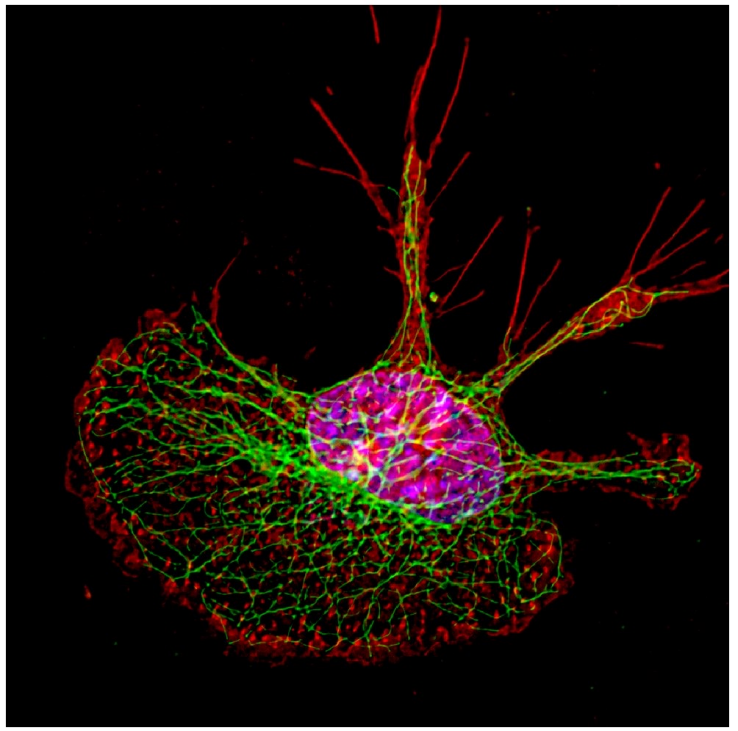
Deconvoluzione e Computational Clearing rimuovono la sfocatura con il calcolo

Un algoritmo di deconvoluzione ricostruisce l'immagine riassegnando alla luce il corretto piano focale

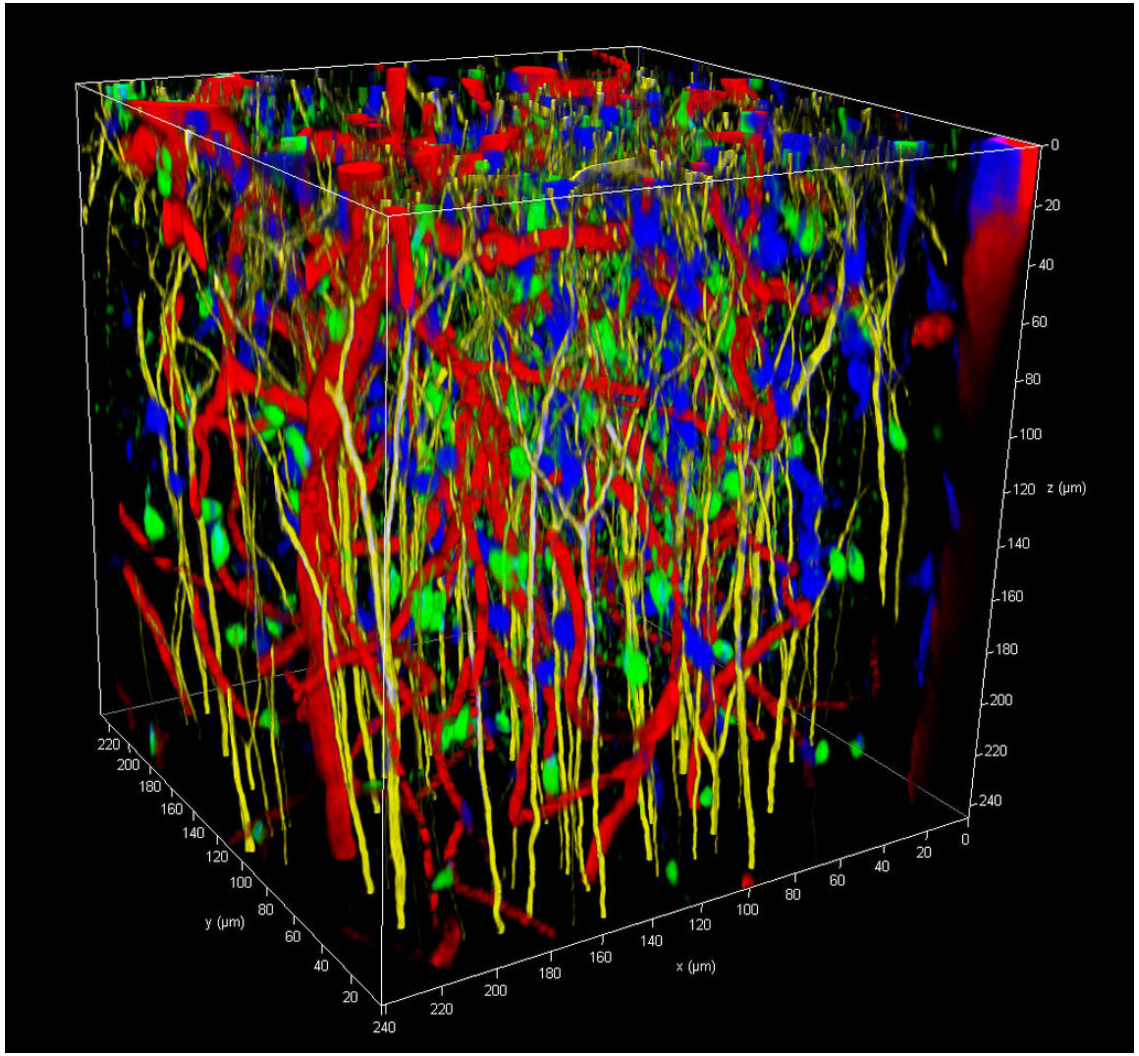
Pro: usa tutta la luce emessa.

Computational clearing: separa il segnale a fuoco dallo sfondo diffuso fuori fuoco e sottrae lo sfondo.



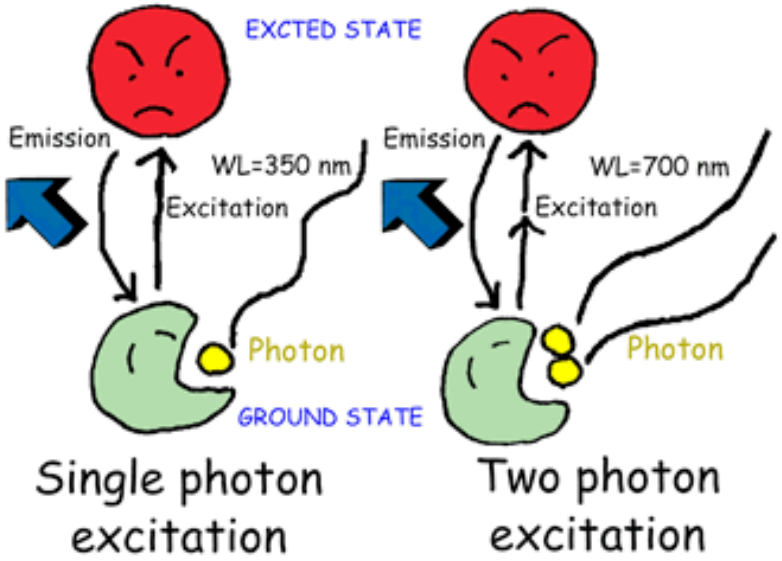


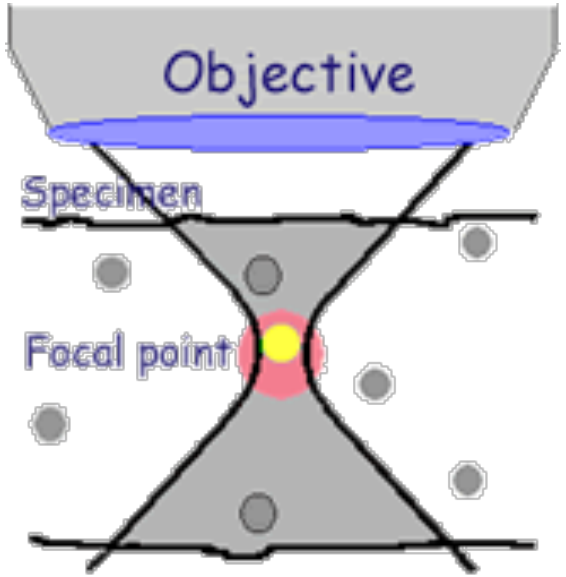
Microscopia multiphoton per elevata penetranza (anche per analisi in vivo)



MICROSCOPIA A 2 FOTONI

2-photon/multiphoton excitation microscopy





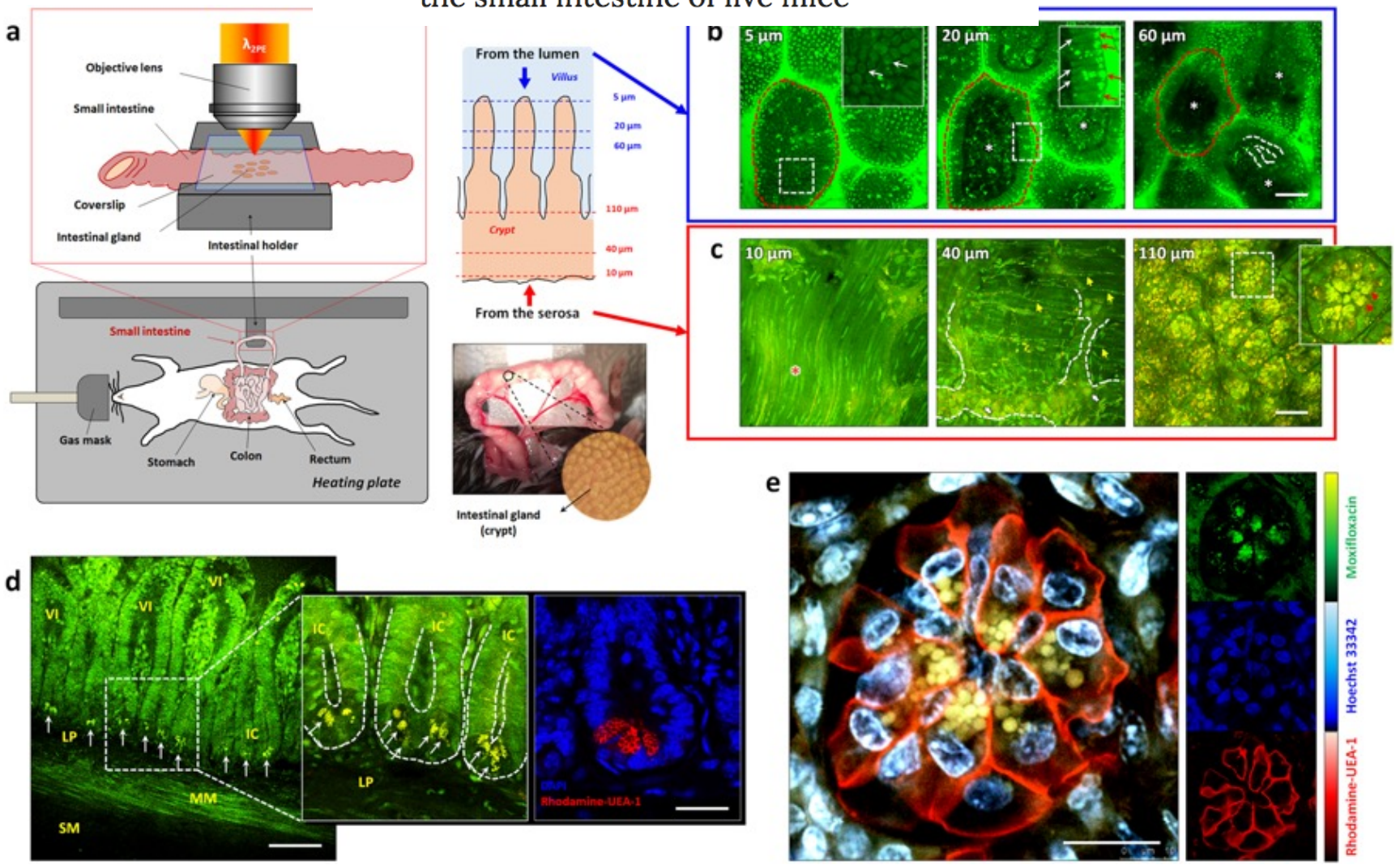
Eccitazione mediante **assorbimento simultaneo di due fotoni nell'infrarosso** (800-900 nm): la lunghezza d'onda della luce di eccitazione è maggiore di quella della luce emessa, ma l'energia fornita è comunque maggiore (eccitazione = 2 fotoni, emissione = 1 fotone)

La luce IR assicura **un'elevata penetrabilità** nei tessuti di organismi viventi e un limitato scattering

MENU SCIENTIFIC REPORTS

Article | OPEN | Published: 21 September 2018

Two-photon microscopy of Paneth cells in the small intestine of live mice



Microscopia lightsheet per imaging di campioni voluminosi

