



Istituto Giannina Gaslini



Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation

Linee guida per l'uso delle cellule epiteliali fornite dal Servizio Colture Primarie presso il Laboratorio di Genetica Molecolare (Istituto G. Gaslini, Genova)

Lo scopo del Servizio è di fornire un modello biologico rilevante per lo studio della fisiopatologia della fibrosi cistica e la valutazione di strategie terapeutiche. Il numero limitato di bronchi a disposizione e l'impossibilità di amplificare le cellule oltre un numero relativamente basso di passaggi richiedono un controllo accurato sul loro corretto uso.

Pertanto il richiedente deve fornire nella scheda apposita una breve descrizione dello studio che permetta di valutare la compatibilità degli esperimenti proposti con le finalità del Servizio ed il corretto utilizzo delle cellule stesse. In particolare, lo studio deve prevedere l'uso di cellule che, dopo un'opportuna fase di espansione per aumentarne il numero, siano fatte differenziare su un supporto poroso (es. Transwell o Snapwell) possibilmente in condizione di interfaccia aria-liquido. Per tutelare la riservatezza sui risultati del proprio progetto di ricerca, non è necessario che il richiedente riveli dettagli (es. identità di geni, proteine, meccanismi molecolari specifici). Tuttavia una descrizione generale che faccia capire le finalità dello studio e le metodiche utilizzate servirà alla Commissione esaminatrice per giudicare la validità dello studio e per procedere con l'approvazione sull'uso delle cellule richieste.

Il Servizio fornirà fiale di cellule bronchiali congelate (500.000 per fiala) possibilmente al terzo passaggio. Dopo lo scongelamento, l'utilizzatore potrà espandere il numero di cellule attraverso due ulteriori passaggi su plastica nel terreno proliferativo privo di siero fornito dal Servizio (LHC9/RPMI 1640). Le cellule così ottenute (circa 20 – 25 milioni) potranno essere seminate su supporti porosi (es. 40 – 50 Snapwell da 1 cm² oppure 8 – 10 Transwell da 2.5 cm²). Con l'uso di un terreno differenziativo (DMEM/F12 + siero + supplementi), e la condizione di interfaccia aria-liquido, le cellule raggiungono in 3-4 settimane lo stato di epitelio polarizzato e ciliato. Gli epiteli così ottenuti possono essere utilizzati per misure di trasporto ionico transepiteliale, immunofluorescenza, estrazione di proteine per western blot e immunoprecipitazione, estrazione di RNA per analisi di espressione genica con RT-PCR e microarray.