

Università degli Studi di Padova – Dipartimento di Ingegneria Industriale

Tesi di Laurea Triennale in Ingegneria Chimica e dei Materiali

***TRATTAMENTO DI SFEROIDI DI GLIOBLASTOMA CON MONOCITI
INGEGNERIZZATI UTILIZZANDO UN DISPOSITIVO MICROFLUIDICO
CHE SIMULA LA BARRIERA EMATO-ENCEFALICA***

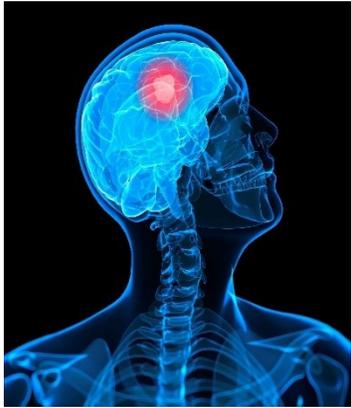
Relatore: Prof.ssa Elisa Cimetta

Correlatore: Ing. Sara Micheli

Studente: *Riccardo Neodo*

Matricola: 2034496

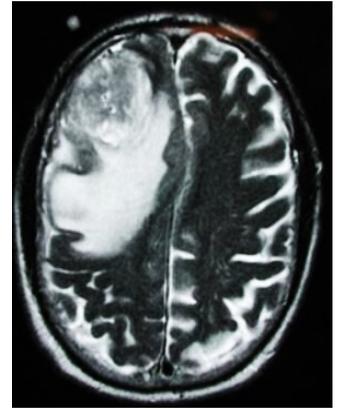
Padova, 05/07/2024



Il Glioblastoma (GB) è una forma aggressiva e maligna di tumore cerebrale



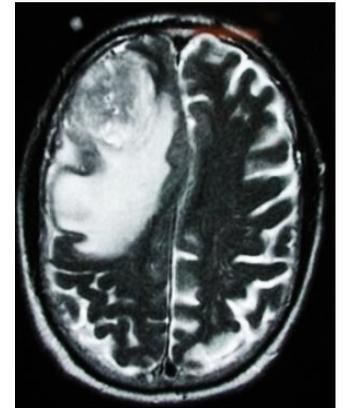
- Alta malignità
- Elevata crescita e infiltrazione nel tessuto cerebrale
- Prognosi sfavorevole nonostante trattamento aggressivo





Il Glioblastoma (GB) è una forma aggressiva e maligna di tumore cerebrale

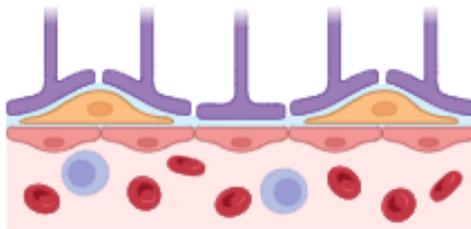
- Alta malignità
- Elevata crescita e infiltrazione nel tessuto cerebrale
- Prognosi sfavorevole nonostante trattamento aggressivo



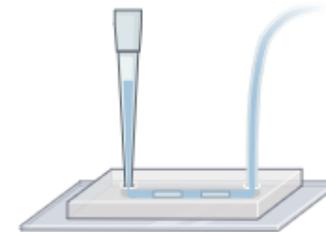
www.dii.unipd.it

Impermeabilità della BBB

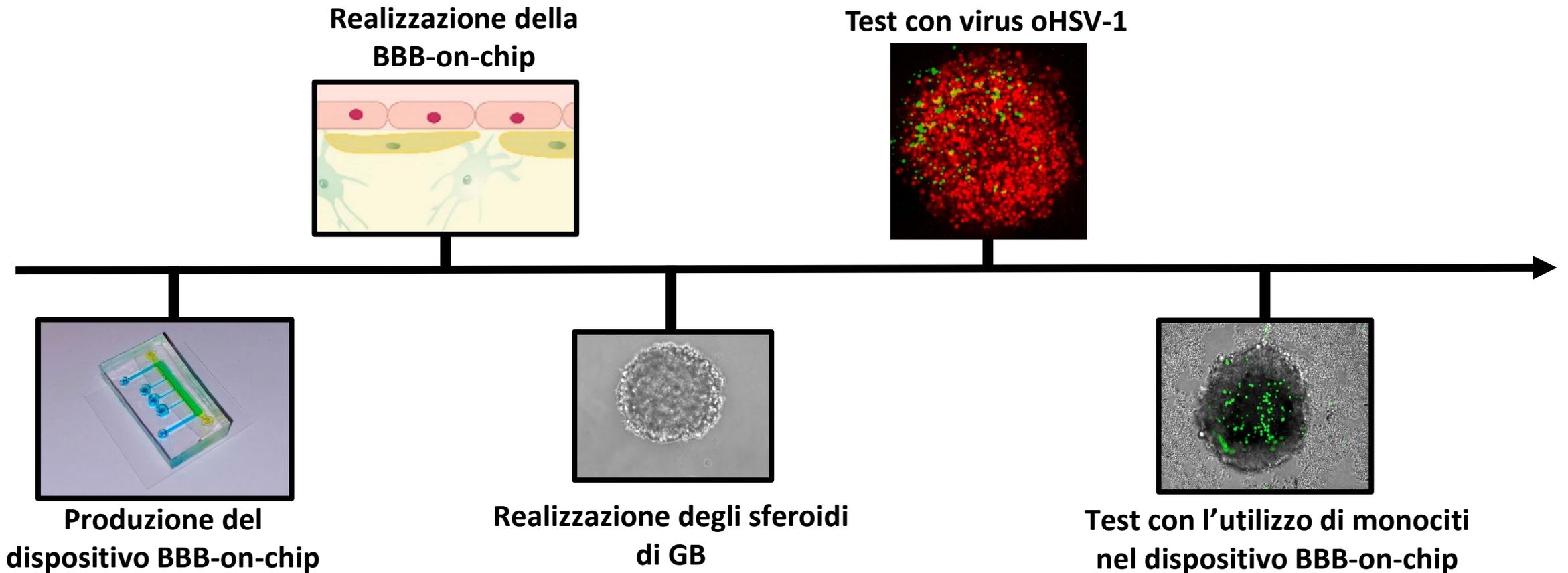
La **BBB** permette il passaggio di nutrienti e fornisce protezione contro patogeni e sostanze esterne



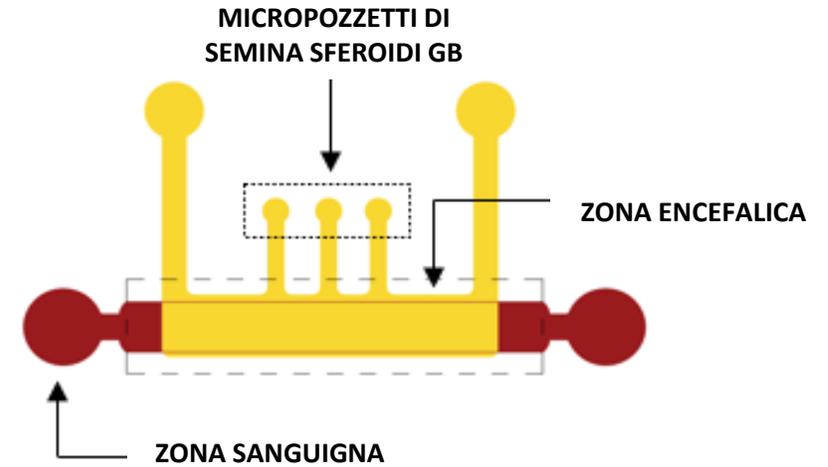
La microfluidica permette la costruzione di modelli di BBB in vitro in grado di mimare il corpo umano



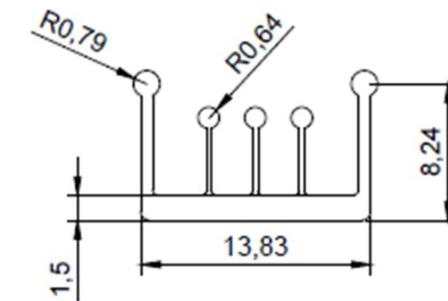
L'obiettivo del progetto è l'utilizzo di un dispositivo microfluidico che simula la barriera ematoencefalica per testare l'utilizzo di monociti ingegnerizzati sul Glioblastoma



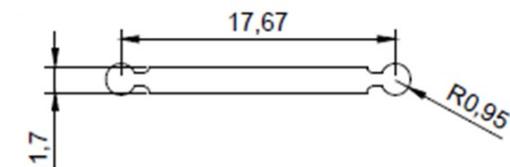
Design con **AutoCAD®** della geometria



LAYER INFERIORE
ALTEZZA = 250 μ m



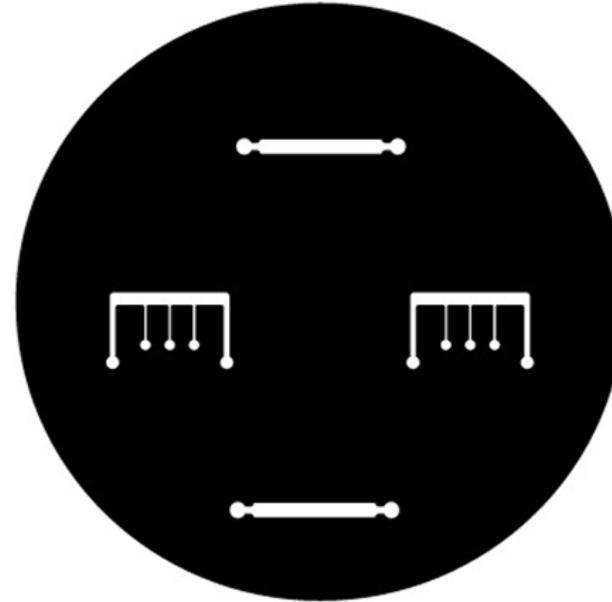
LAYER INFERIORE
ALTEZZA = 250 μ m



Design con **AutoCAD**® della geometria

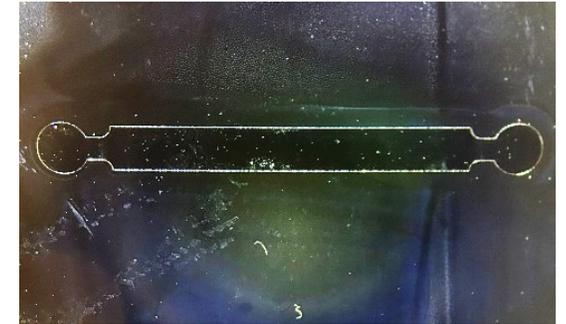


Rielaborazione del layout con **Adobe Illustrator** e **Fotolitografia** necessaria per creare il master

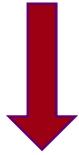


FOTOMASCHERA

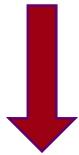
STAMPO DI SILICIO CON GEOMETRIA



Design con **AutoCAD®** della geometria



Rielaborazione del layout con **Adobe Illustrator** e **Fotolitografia** necessaria per creare il master

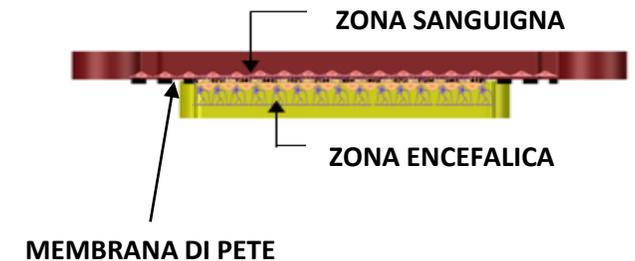
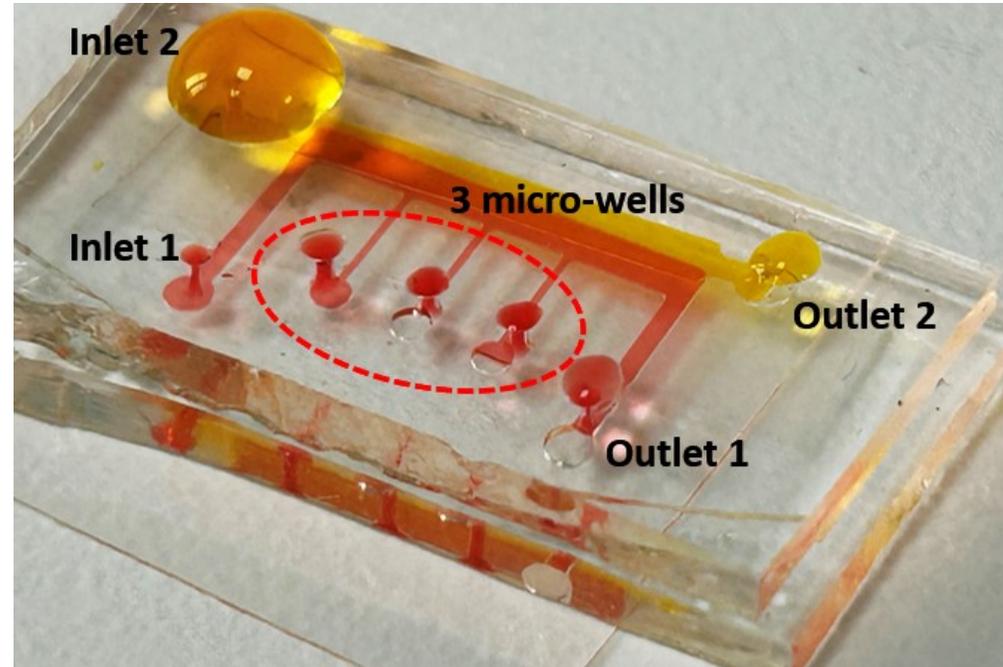


Replica-Molding e **trattamento al plasma** per realizzare la piattaforma finale in PDMS

LAYER SUPERIORE : ZONA SANGUIGNA

MEMBRANA DI PETE ($s = 12 \mu\text{m}$, $\varnothing = 3 \mu\text{m}$)

LAYER INFERIORE : ZONA ENCEFALICA



Day 0

Day 1

Day 7

Semina di Astrociti e Periciti

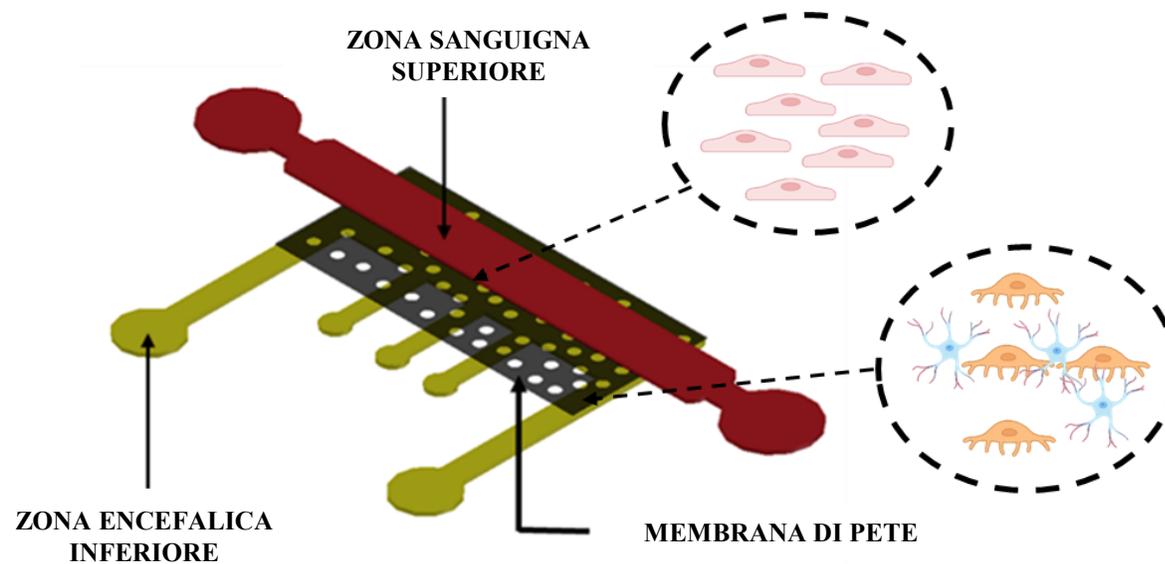
$$\rho_{\text{semina}} = 1 \cdot 10^6 \text{ cells/mL}$$

1/3 Periciti - 2/3 Astrociti

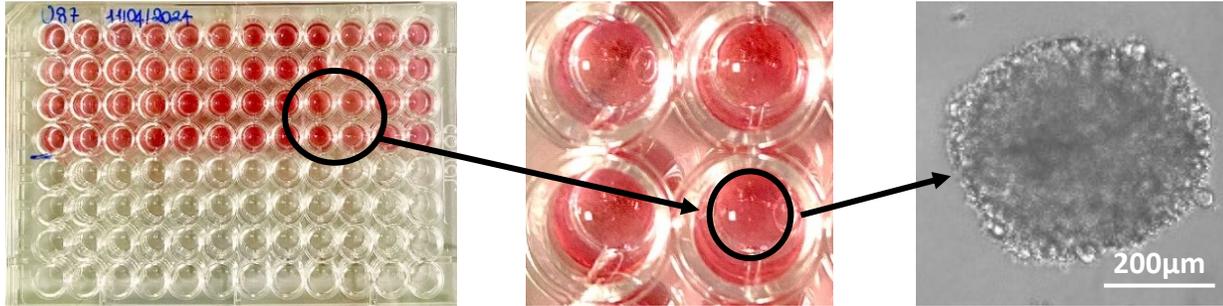
Semina HUVEC

$$\rho_{\text{semina}} = 2 \cdot 10^6 \text{ cells/mL}$$

**Sferoidi di GB integrati
nella BBB-on-chip**

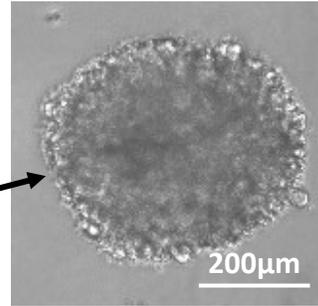
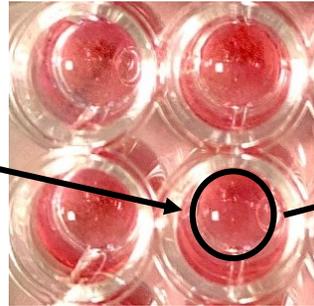


Ottimizzazione protocollo di generazione degli sferoidi di GB con ULA plate

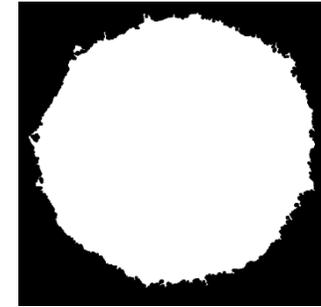


2000 cellule/ pozzetto
in **200μL** di MEDIUM

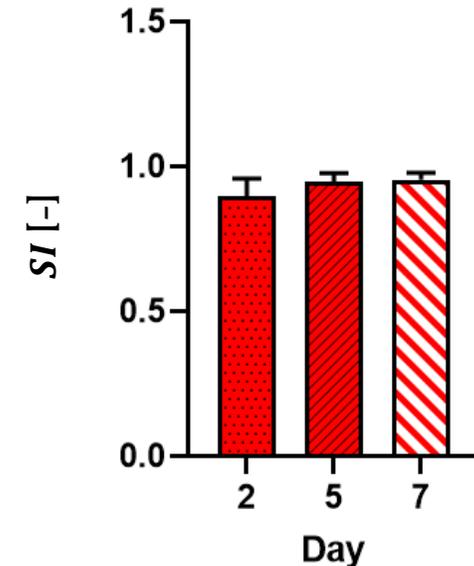
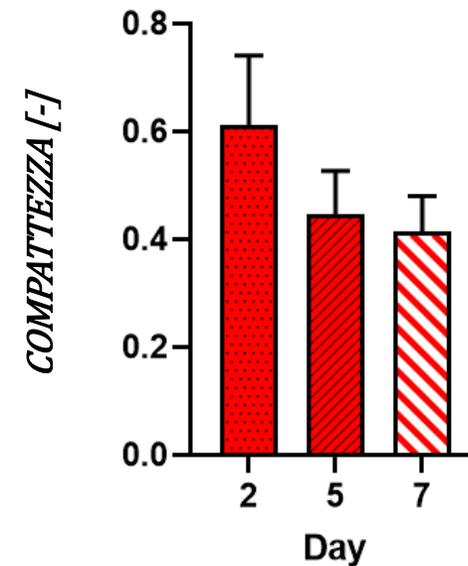
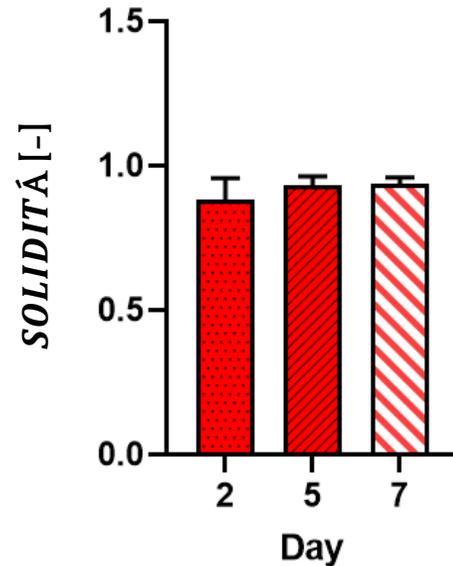
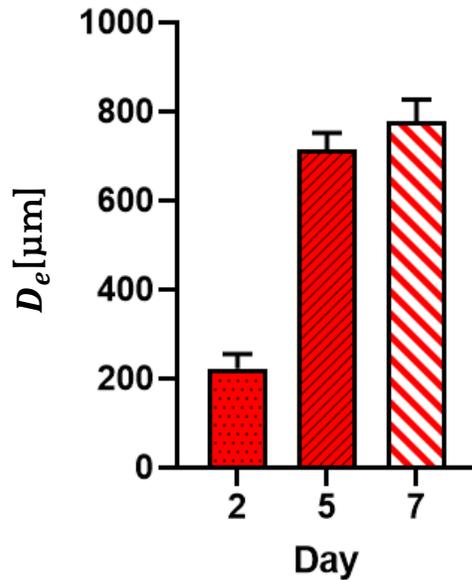
Ottimizzazione protocollo di generazione degli sferoidi di GB con ULA plate



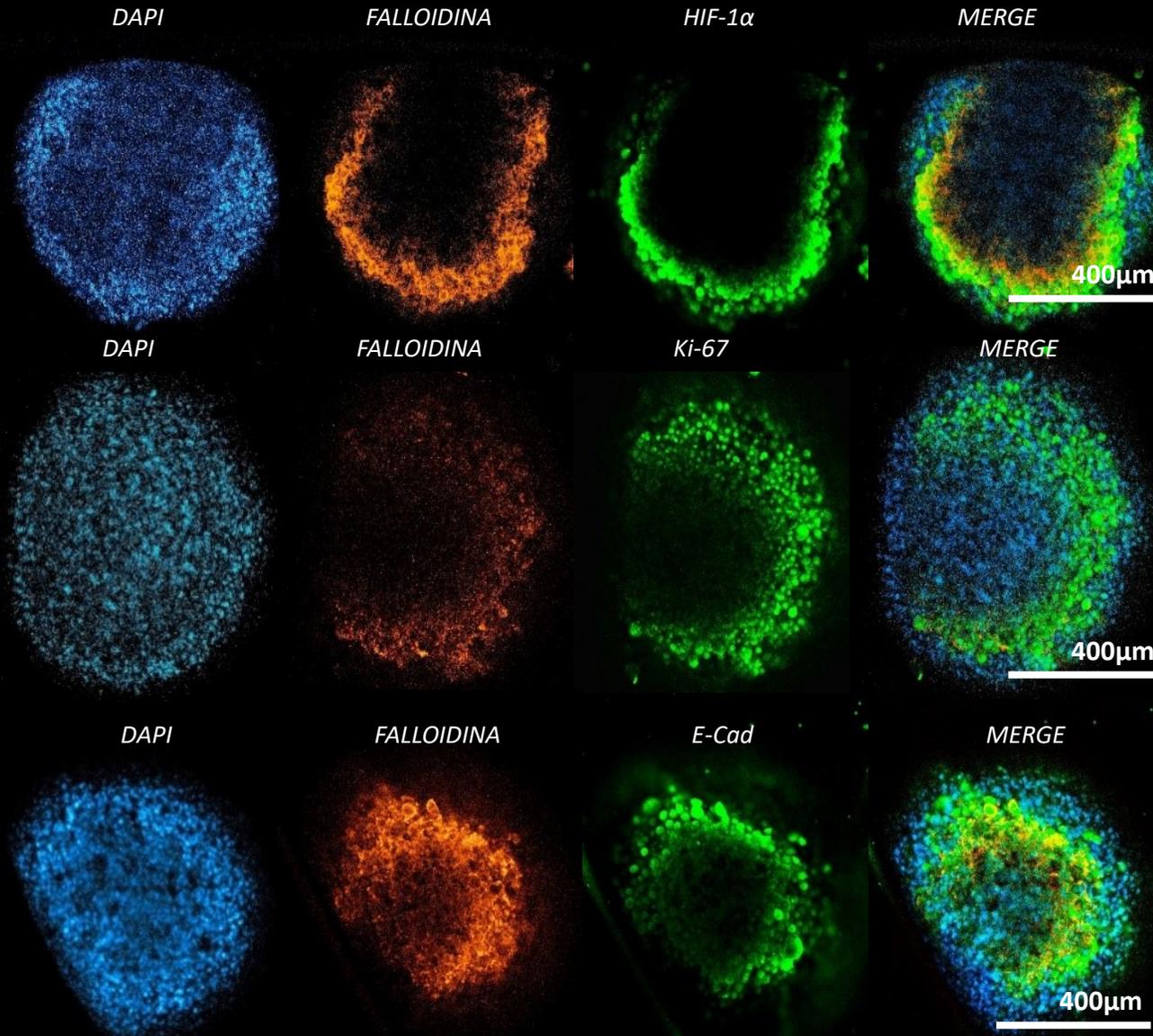
2000 cellule/ pozzetto
in 200µL di MEDIUM



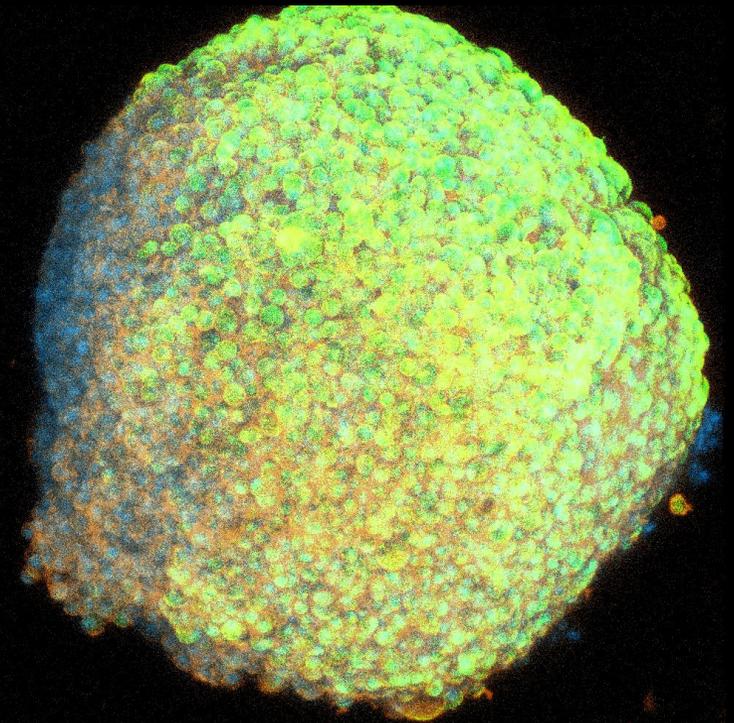
Fotomaschera
ottenuta con AnasP



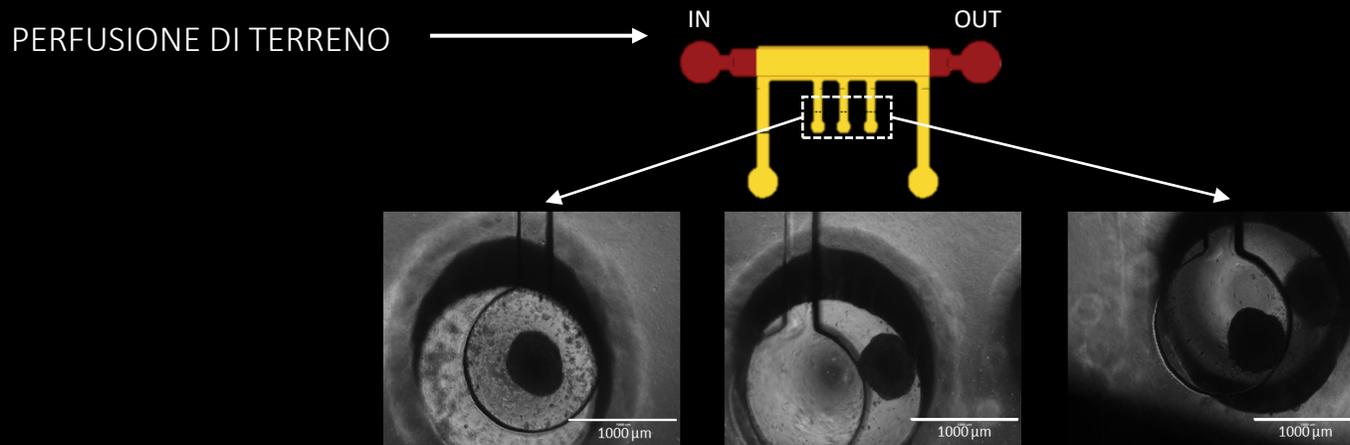
VALIDAZIONE TRAMITE IF DEGLI SFEROIDI DI GB



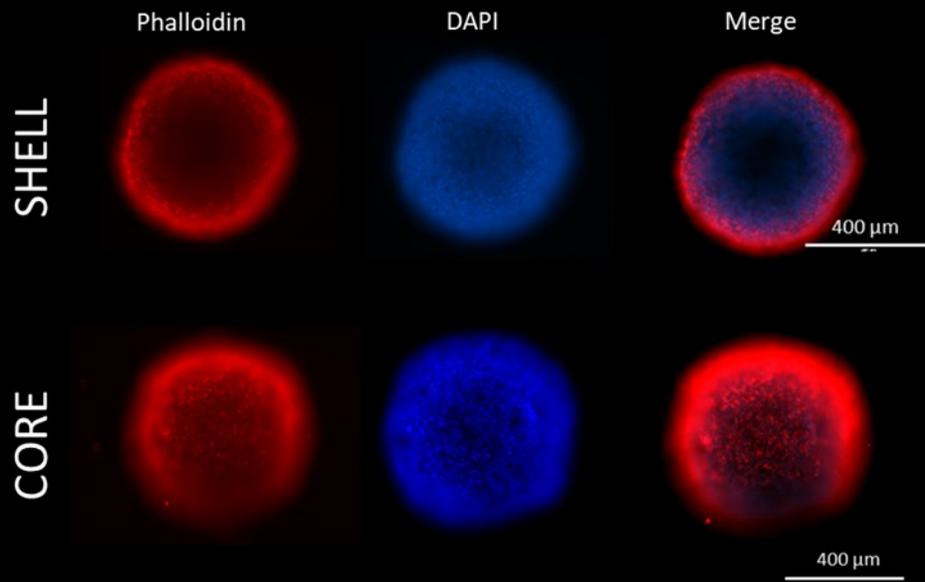
Z-STACK DI Ki-67



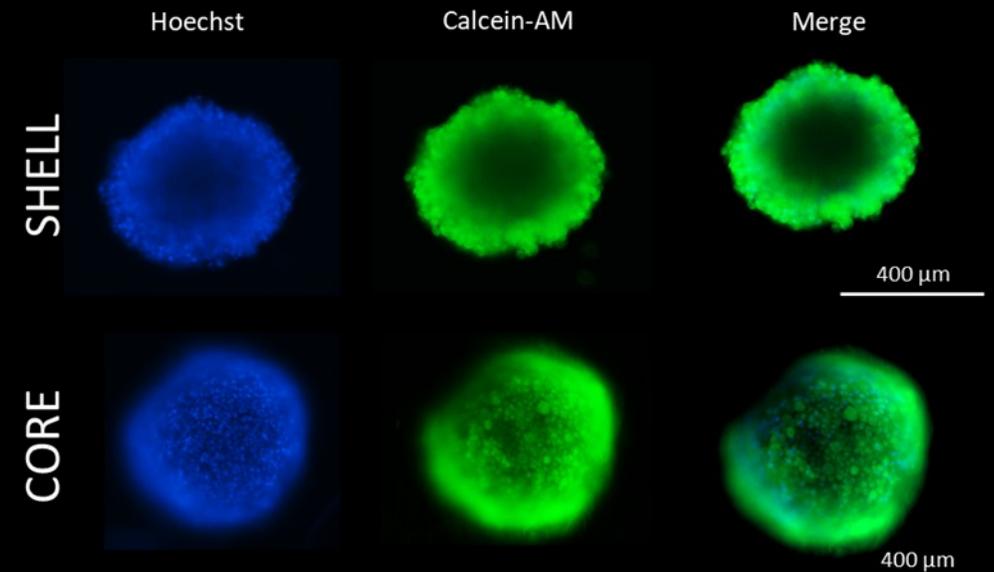
INTEGRAZIONE DEGLI SFEROIDI NELLA BBB-ON-CHIP

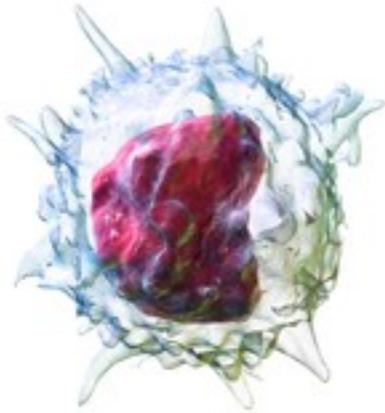


Phalloidina e DAPI staining



Saggio Live/Dead





MONOCITI THP-1

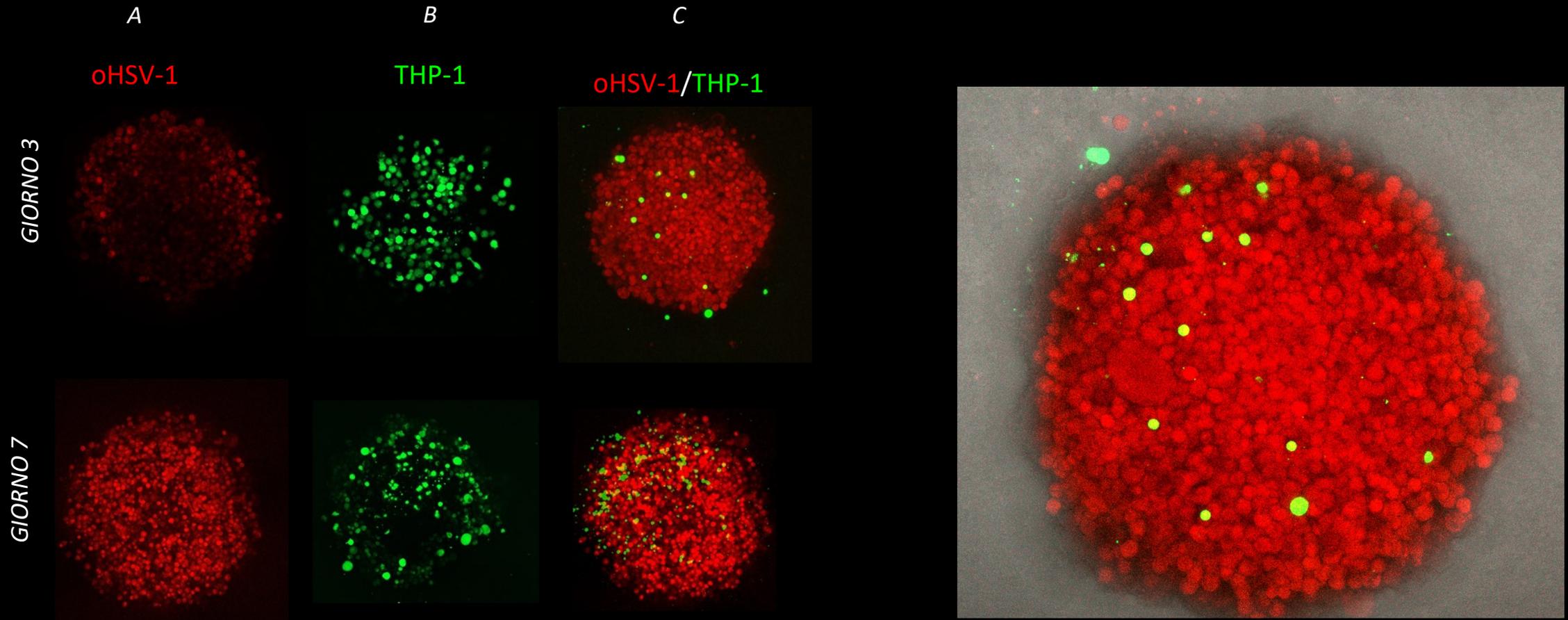
- Globuli bianchi di risposta alle infezioni
- Derivati da paziente leucemico
- Usati nello studio delle interazioni tra patogeni/macrofagi



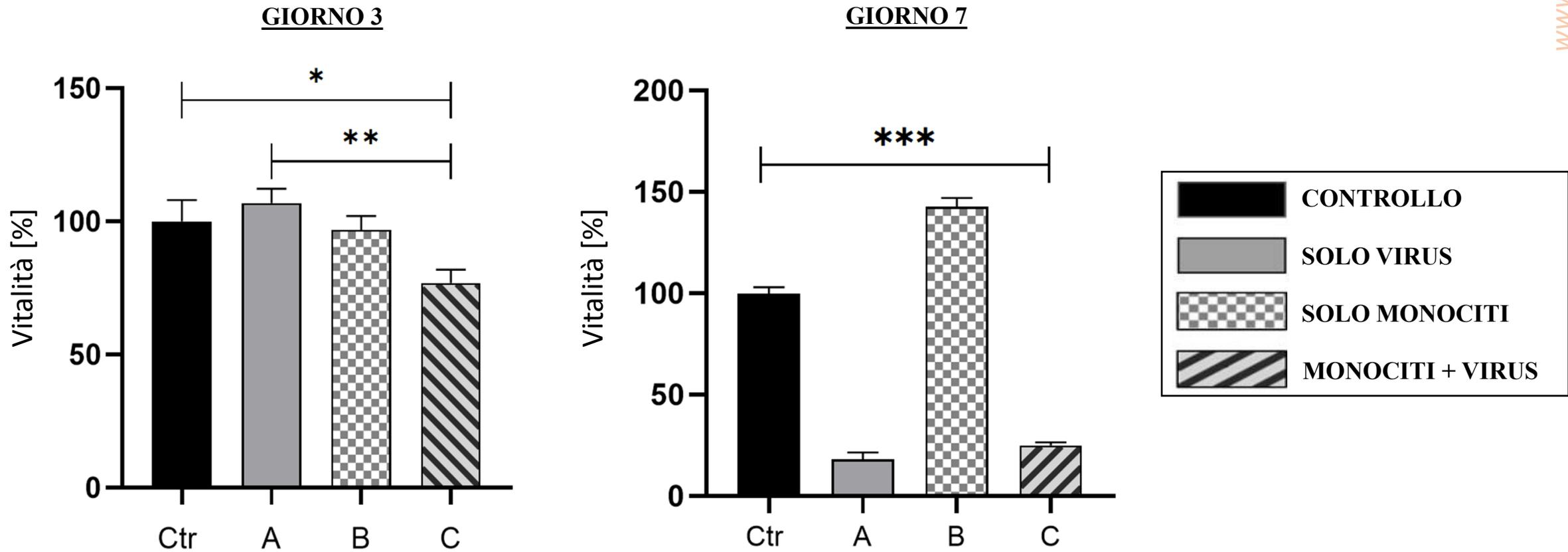
HERPES SIMPLEX oHSV-1

- Responsabile delle vescicole labiali
- Utilizzato in farmaci biologici
- Contrasta cellule target generando una risposta immunitaria

VALIDAZIONE DEI MONOCITI COME CARRIER DI INFEZIONE



Misura la vitalità cellulare nelle strutture tumorali tramite trattamento con **MTT** e successiva misurazione di **Assorbanza** nel campo visibile



PERFUSIONE DELLE CELLULE DI THP-1

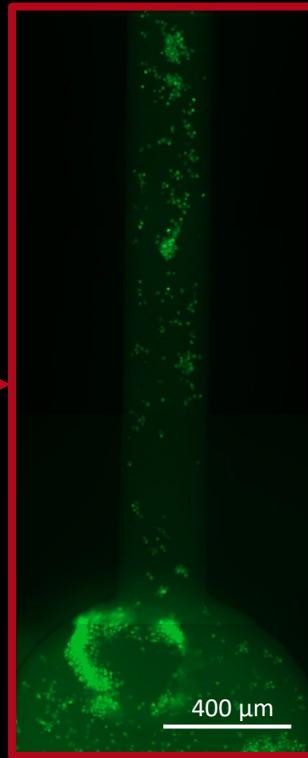
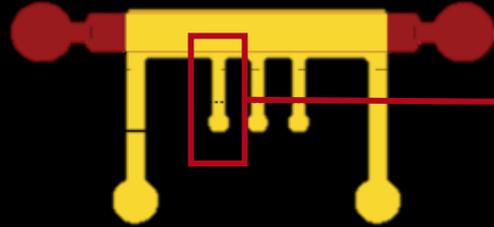
Formazione della
BBB in vitro

Integrazione degli
sferoidi di GB

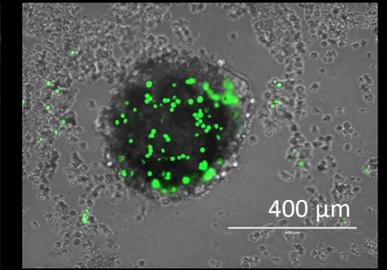
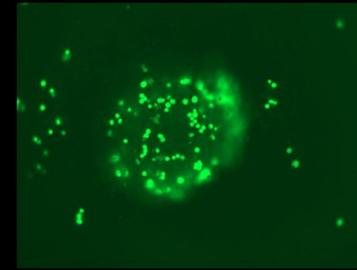
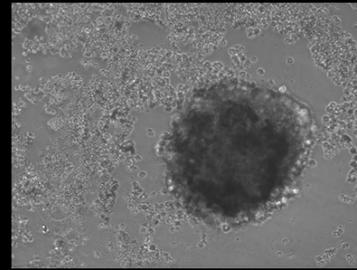
Perfusione delle THP-1

INLET per le THP1

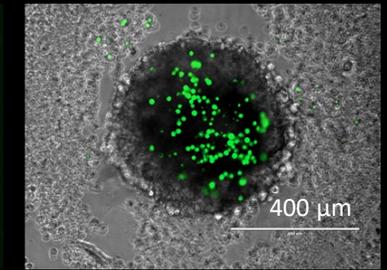
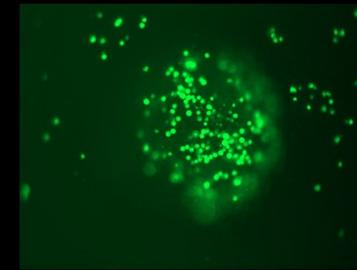
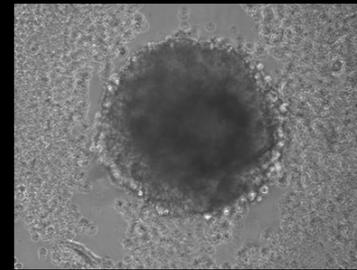
OUTLET per le THP1



24 h DAL TRATTAMENTO



48 h DAL TRATTAMENTO



THP-1 in VERDE con CellTracker™

- Il dispositivo microfluidico realizzato è stato correttamente validato come modello di BBB in vitro
- Gli sferoidi di GB sono stati generati e la loro caratterizzazione morfologica e tramite IF ha confermato la corretta formazione di un modello 3D tumorale
- Gli sferoidi di GB sono stati integrati nel modello di BBB in vitro e hanno mantenuto dopo la perfusione un'alta vitalità e la loro tipica struttura morfologia
- Gli esperimenti condotti hanno dimostrato l'efficacia nell'utilizzo dei monociti come carrier per il trasporto del virus oHSV-1 all'interno degli sferoidi di GB
- Gli esperimenti dinamici hanno dimostrato la capacità dei monociti di attraversare il modello di BBB in vitro e permeare all'interno dello sferoide

Thank you!



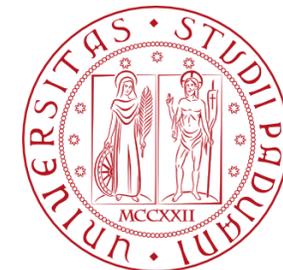
Prof.ssa Elisa Cimetta *Biamet Laboratory*

Sara Micheli
Federico Maggiotto
Eva Dalla Valle
Pina Fusco
Veronica Zingales

Caterina Piunti
Eleonora Zanrè
Marianna Peditto
Anna Fietta
Ilaria Sarto



Fondazione
ISTITUTO DI RICERCA
PEDIATRICA



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA