



autostrade cellulari

Greta Orsi Luca Mazzini

Tutor:
Marianna Barbalinardo
Francesco Valle
Francesca Lazzarotto

18-29/07/2016

INDICE:

- ➤Obiettivo;
- ➤ Preparazione di substrati
 - angolo di contatto;
- >Strategia di fabbricazione
 - μCP (micro-contact printing);
- ➤ Comportamento delle cellule sui substrati fabbricati
 - cellule utilizzate e mantenimento;
- Conclusioni

Medicina Rigenerativa



Obiettivo

Funzionalizzazione di superfici per l'adesione cellulare, in modo spazialmente controllato, tramite patterning per soft-litografia.

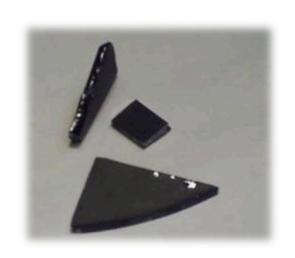


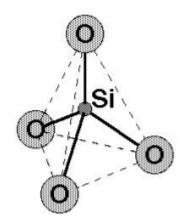
Surface property	Topography	Mechanics	Chemistry
Signals provided	Surface morphology, roughness	Stiffness, elasticity	Adhesion proteins and Growth factors
Fabrication strategy	Micro- and Nano-textured surfaces	Locally controlled Young's modulus	Soft lithography
	Surrecs		
	M. Bianchi et al 2010		F. Valle et al Adv. Biomater. 2010

Preparazione dei substrati

Substrato utilizzato: Silicio (SiOx)

Il silicio è un elemento molto abbondante sulla crosta terrestre, secondo solo all'ossigeno. In natura si trova in una forma cristallina con reticolo cubico del tipo del diamante, nel quale un atomo di silicio è unito tetraedricamente ad altri atomi di ossigeno.





Funzionalizzazione del substrato tramite immersione in

(3-Aminopropyl)triethoxysilane

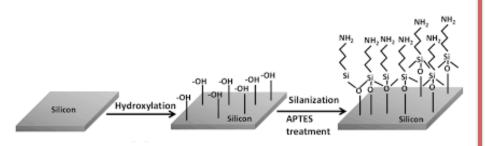
APTS

octadecyltrichlorosilane OTS

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE (IN APTS)

Pulizia superficie:

- Sonicazione in acetone 15 min;
- Sonicazione in isopropanolo 15 min;
- Asciugatura con azoto;

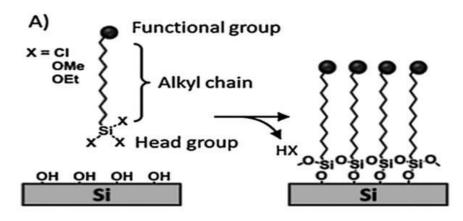


Lavaggio in toluene Asciugatura con azoto

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE (IN OTS)

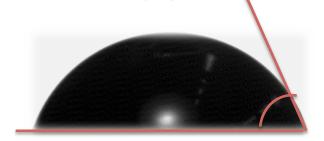
Pulizia superficie:

- Sonicazione in acetone 15 min;
- Sonicazione in isopropanolo 15 min;
- Asciugatura con azoto;

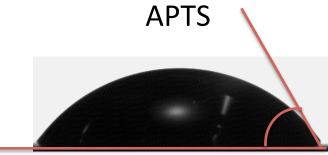


Lavaggio in esano Asciugatura con azoto

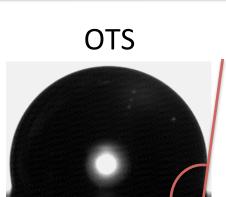
ANGOLO DI CONTATOLO



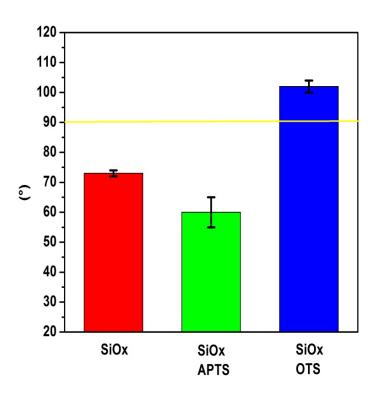
$$\theta = 72^{\circ}$$



$$\theta = 63^{\circ}$$



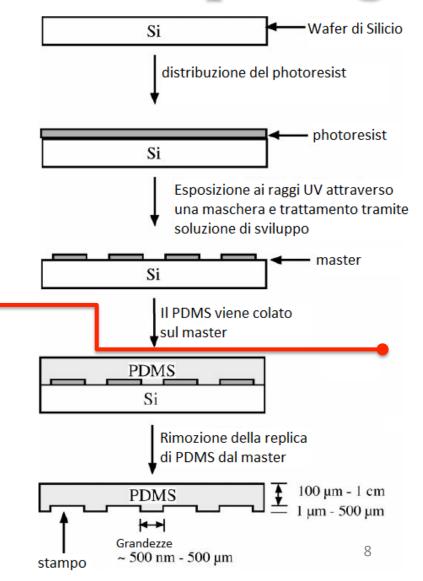
$$\theta = 102^{\circ}$$

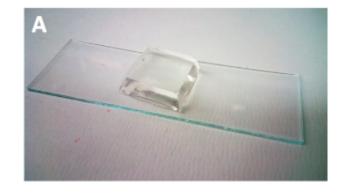


Strategie di fabbricazione

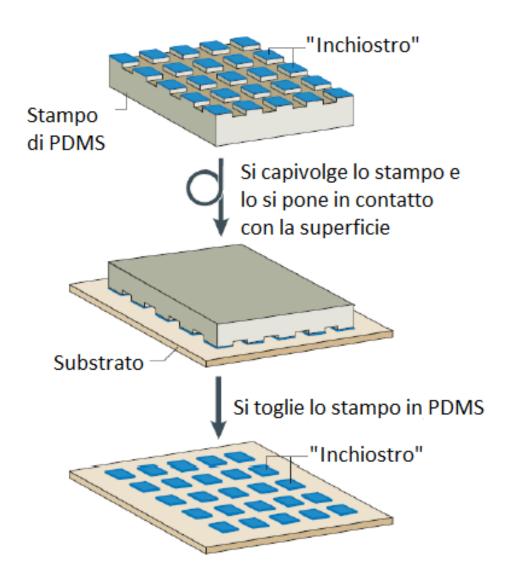
Micro-contact printing

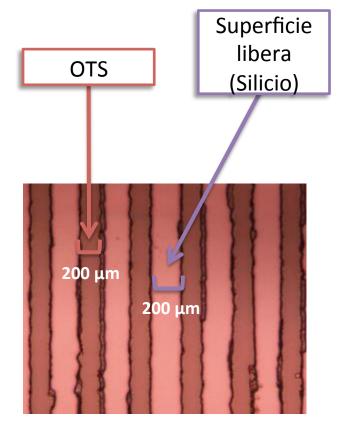
- Master che presenta le caratteristiche morfologiche che si vogliono stampare (positivo).
- Stampo in PDMS (negativo)
- "Inchiostro"
- Superficie da patternare





Micro-contact printing





Comportamento delle cellule

Cellule utilizzate: Fibroblasti

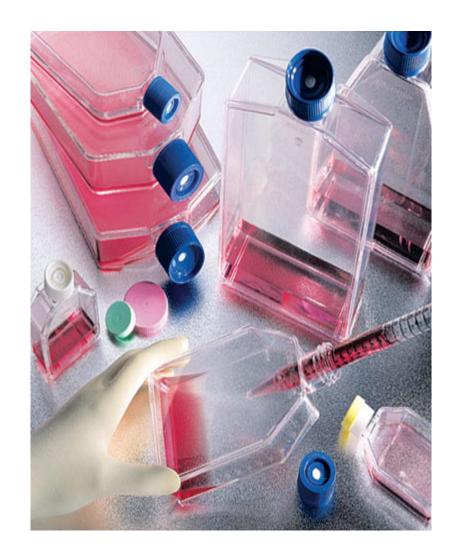
- I fibroblasti sono cellule presenti nei **tessuti connettivi** e hanno la funzione di sintetizzare i componenti della matrice extracellulare.
- I fibroblasti sono cellule adese, fusiformi con <u>prolungamenti citoplasmatici</u> che arrivano fino a 30mm; il loro ciclo cellulare è di 12ore.
- I fibroblasti da noi utilizzati sono di origine animale (NIH-3T3 mouse embryonic fibroblasts) e sono stati geneticamente modificati tramite l'inserimento del gene che codifica per la proteina GFP (GreenFluorescentProtein) in modo da poter essere osservati al microscopio a fluorescenza.



Fibroblasto in divisione

Mantenimento cellulare

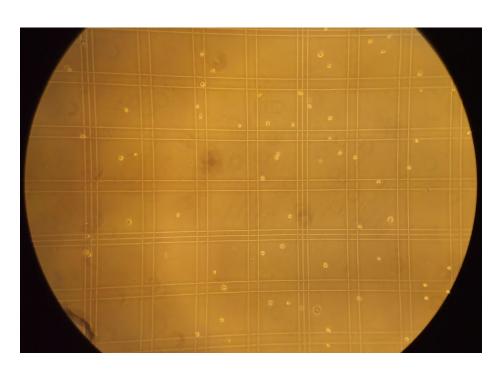
- Il mantenimento di cellule in vitro serve per studiare fenomeni biologici come la crescita e l'adesione delle cellule su un determinato substrato.
- Le cellule crescono all'interno di fiasche contenenti il mezzo cellulare specifico per il tipo di cellula.
- Le cellule che abbiamo coltivato sono cresciute in incubatore a 37°C con una concentrazione del 5 % di CO₂.
- Durante la coltura cellulare sono necessarie alcune procedure atte a mantenere condizioni ottimali alla crescita cellulare, come il cambio medium e lo split.
- Per quanto riguarda l'osservazione delle cellule al microscopio fluorescente o al SEM, è prima necessaria una fissazione.



Divisione e conta

- Quando le cellule arrivano a confluenza (ovvero quando il numero di cellule diventa elevato e si perdono le condizioni ideali per la coltura cellulare) occorre eseguire lo split.
- rompere i contatti focali che hanno col substrato, tramite l'enzima **tripsina**, in modo da poter risospendere le cellule e trasferirle nella camera di conta.
- Per stimare il numero di cellule presenti nel campione si esegue la conta con la camera di Burker.



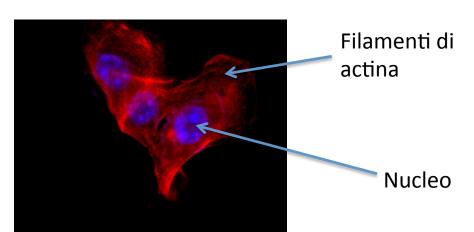


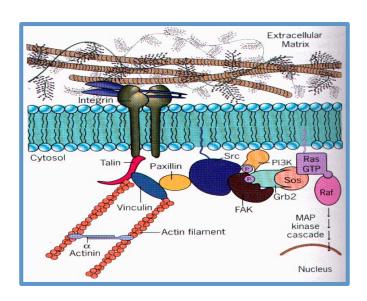
Camera di Burker al microscopio ottico

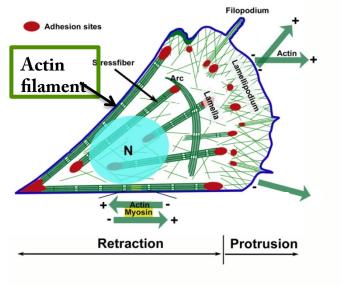
Saggio di immunofluorescenza

Assay Protocol

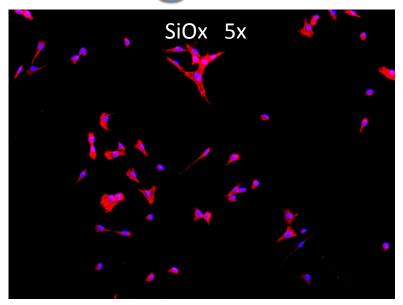
- Fissare le cellule con 4% Paraformaldeide in 1x PBS
- 2. TritonX100
- Incubare con l'anticorpo secondario Falloidina
- 4. La colorazione dei nuclei può essere effettuata tramite l'incubazione delle cellule con DAPI
- 5. Le immagini a fluorescenza possono essere osservate utilizzando un microscopio a fluorescenza

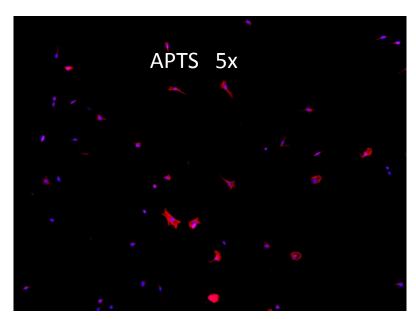


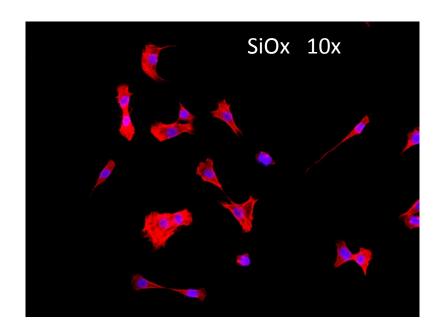


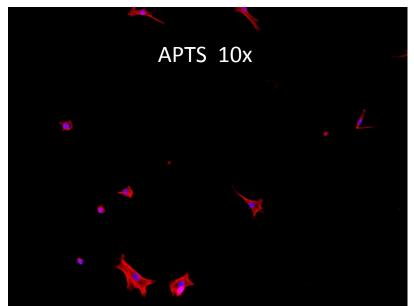


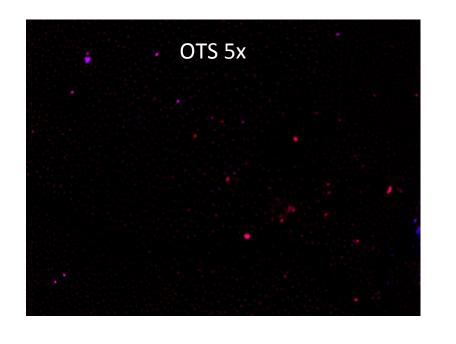
Immagini 24h

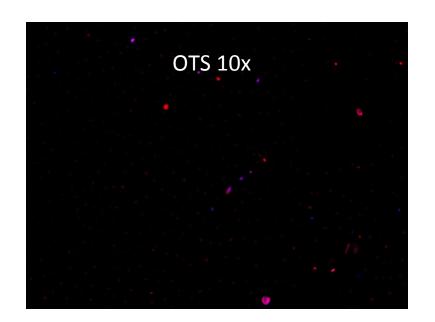


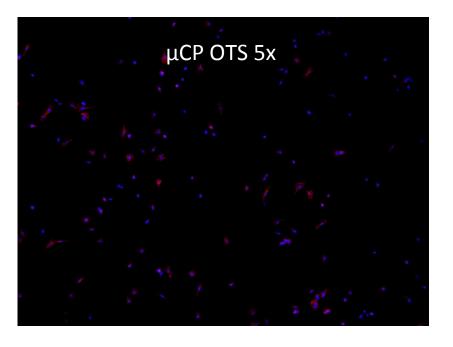


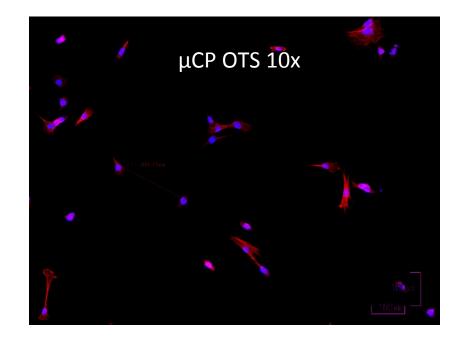


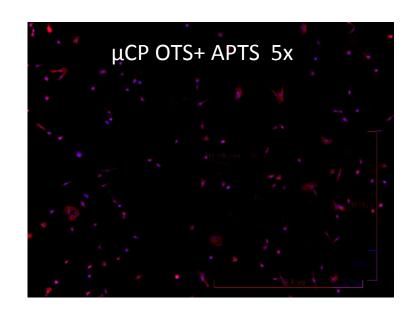


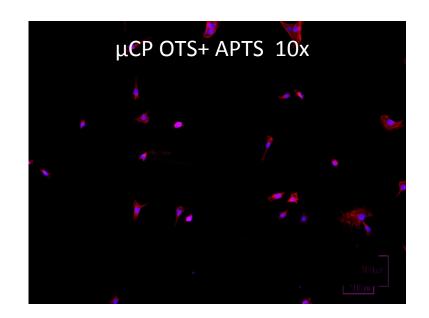


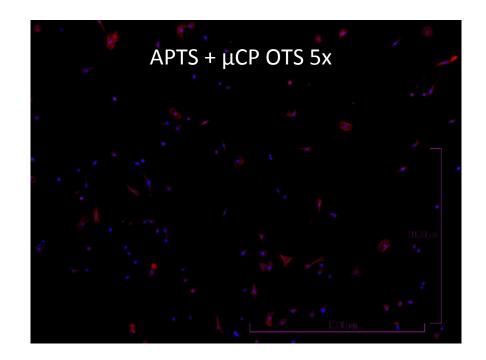


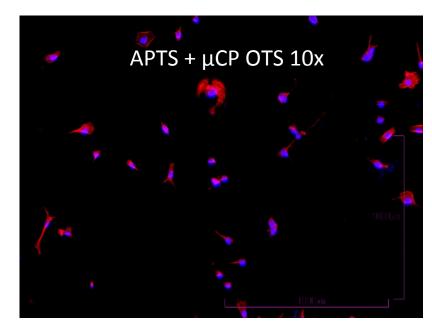




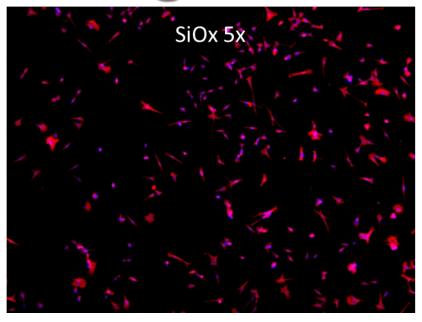


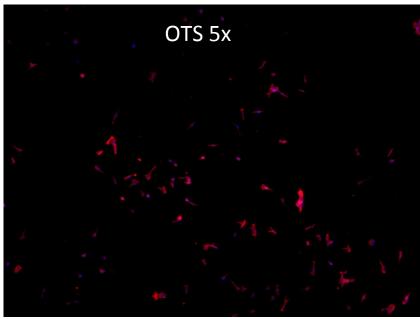


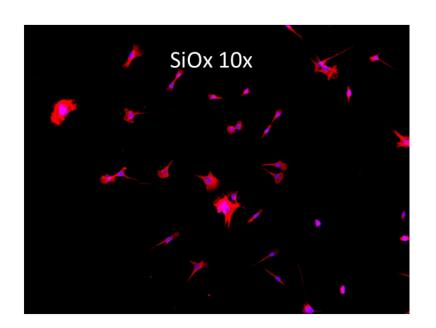


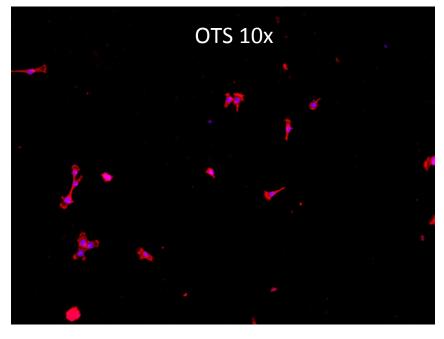


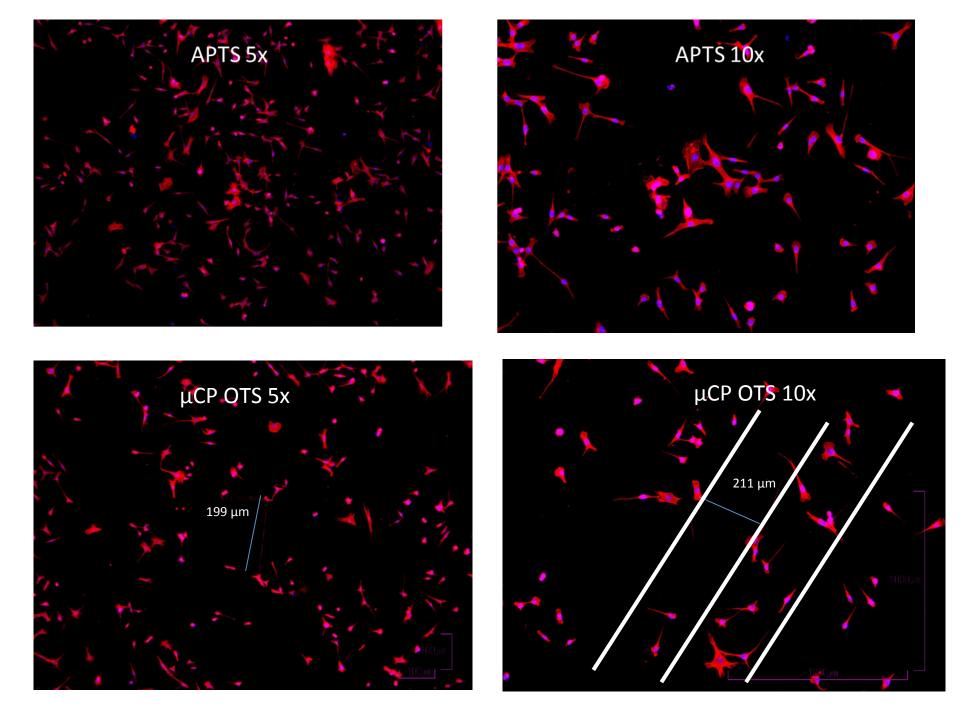
Immagini 48h

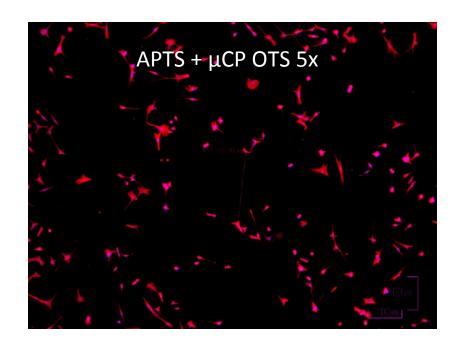


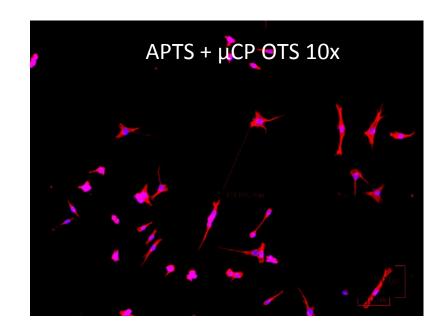


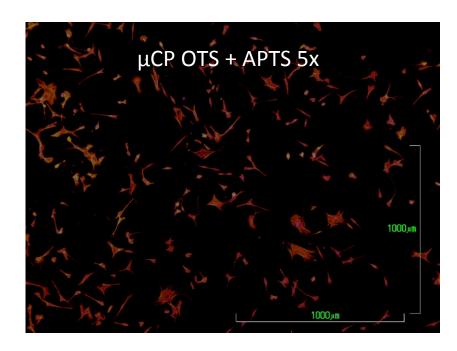


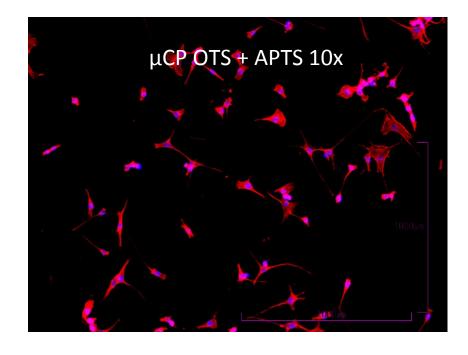












Conclusioni

- ➤ Microfabbricazione per il controllo di crescita e adesione cellulare;
- ➤ Limitazione della crescita cellulare tramite pattern di molecole anti-adesive;
- Fabbricazione di superfici con aree di adesione cellulare e densità controllata;
- ➤ Metodologie innovative compatibili con un ampia serie di molecole biologiche e non