



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI SCIENZE

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

TISSUE-ENGINEERED HUMAN EMBRYONIC STEM CELL-CONTAINING CARDIAC PATCHES:
EVALUATING RECELLULARIZATION OF DECELLULARIZED MATRIX

Patch cardiache contenenti cellule staminali embrionali umane ingegnerizzate nei tessuti:
valutazione della ricellularizzazione della matrice decellularizzata

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Adriana Canapa

Candidata:

Alessia Di Claudio, 1081468

Anno Accademico 2019/2020



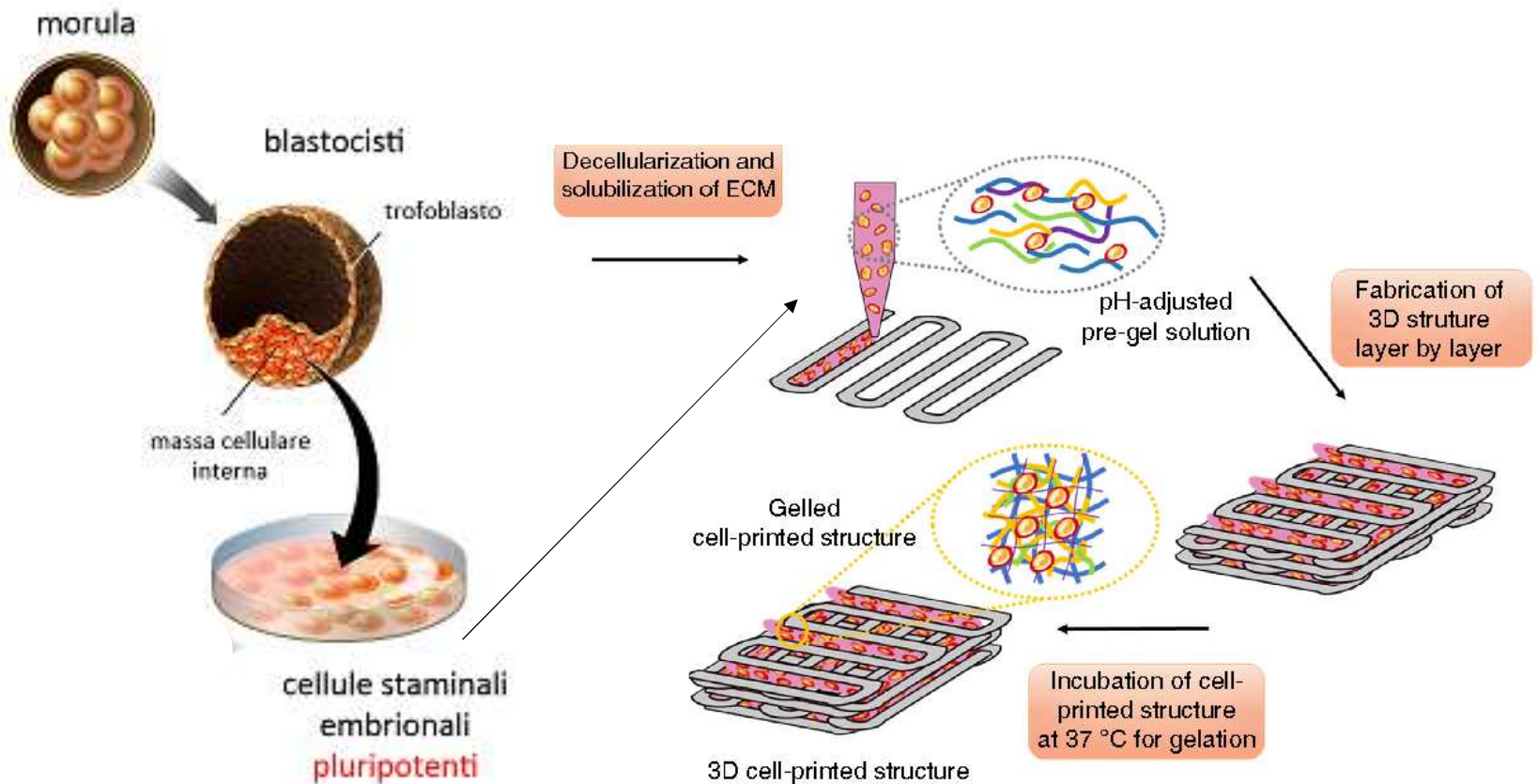
Hochman-Mendez, Camila et al.2020.Tissue-engineered human embryonic stem cell-containing cardiac patches: evaluating recellularization of decellularized matrix, Journal of tissue engineering, volume 11: 1-12, DOI:[10.1177/2041731420921482](https://doi.org/10.1177/2041731420921482)

- Uno dei principali problemi che la medicina moderna deve affrontare è rappresentato dalla sostituzione di organi e tessuti in pazienti affetti da particolari patologie invalidanti
- Ricorrendo a **sostituti biologici** provenienti da individui della stessa specie (allograft) o di specie differenti (xenograft), ci si imbatte nei problemi di scarsa disponibilità di tessuti e nei fenomeni di rigetto che costringono il paziente a sottoporsi a debilitanti terapie immunosoppressive
- Per cercare una soluzione a questi problemi, negli ultimi due decenni la comunità scientifica si è rivolta principalmente all'**ingegneria tissutale**
- In particolare lo scopo è quello di ricreare in vitro tessuti e organi con le caratteristiche tipiche del ricevente, in modo da non rendere più necessari donatori esterni, minimizzando così i rischi di incompatibilità e di rigetto



Cos'è un patch cardiaco?

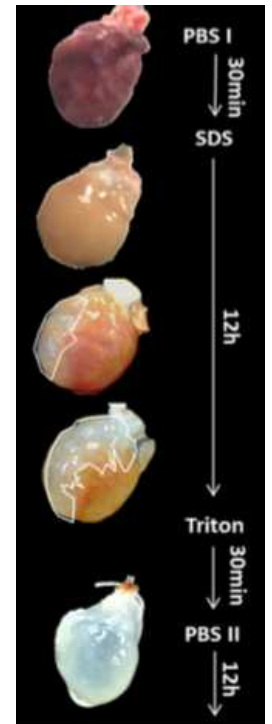
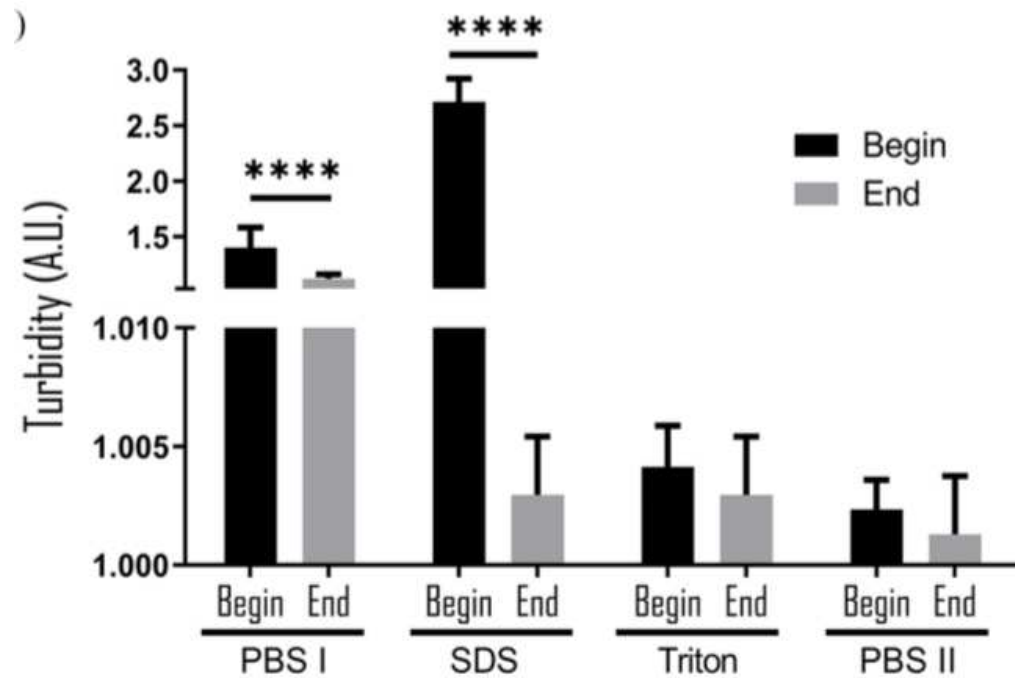
Un patch cardiaco è un pezzo funzionante di tessuto cardiaco coltivato in laboratorio, in particolare è uno scaffold di matrice extracellulare cardiaca decellularizzata di ratto utilizzato come base per lo sviluppo e la differenziazione di cellule staminali embrionali umane pluripotenti





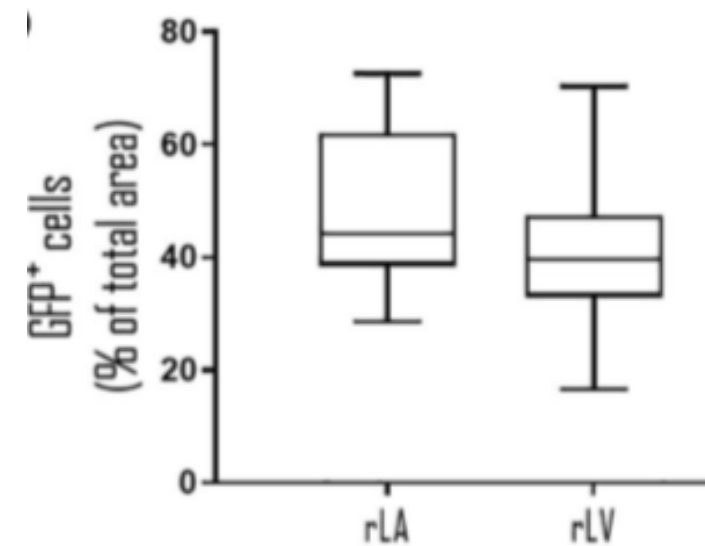
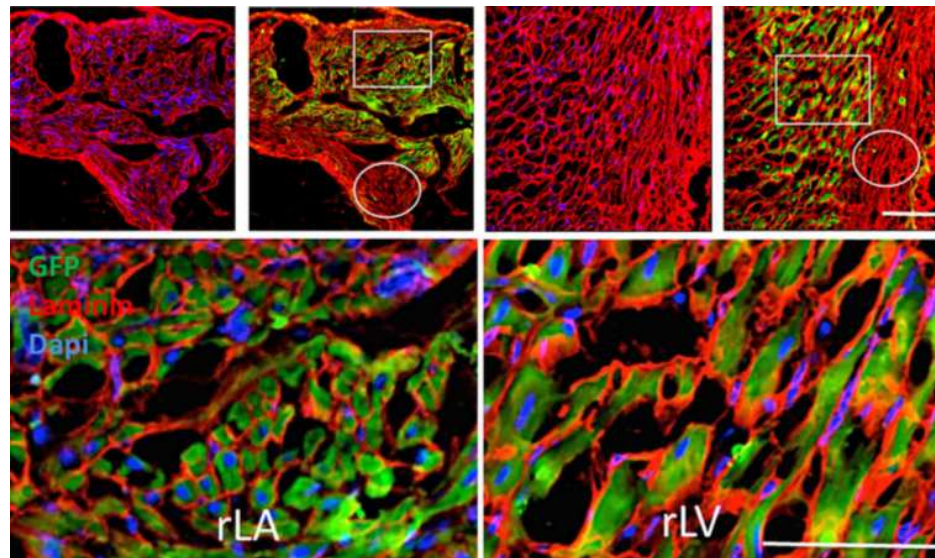
1. DECELLULARIZZAZIONE

- Si rimuove materiale citoplasmatico e nucleare da una matrice extracellulare di un cuore cadaverico di ratto
- Il processo prevede la presenza di un **bioreattore** e viene monitorato quantificando la torbidità del deflusso dell'output durante la perfusione cardiaca che è correlata alla rimozione delle cellule
- Raccolta di campioni di perfusione dall'uscita e misurazione dell'assorbanza (280nm) correlata al grado di **torbidità**



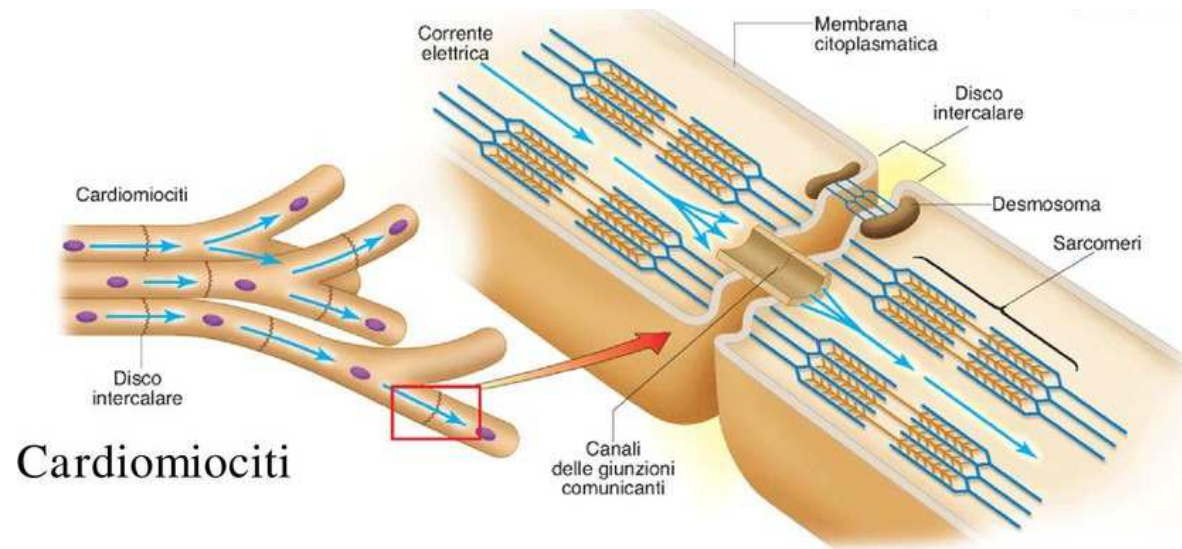
2. RICELLULARIZZAZIONE DELLO SCAFFOLD

- Gli scaffold atriali e ventricolari sono stati coltivati separatamente su un **agitatore orbitale** impostato su 30-50 rpm
- Dopo 48h si è calcolata la percentuale di ritenzione cellulare quantificata in termini di area di tessuto coperta dalla colorazione GFP (verde) tramite l'**imaging a fluorescenza**
- rLV comprendeva il 47,97% di cellule GFP mentre rLA comprendeva il 49,28%



3. DIFFERENZIAZIONE DEI CARDIOMIOCITI

- Le cellule staminali embrionali (hESC) sono state differenziate per formare cardiomiociti (CM) in corpi embrioidi cardiaci.
- L'efficienza di differenziazione è stata valutata utilizzando la **citometria a flusso** e analizzando successivamente la colorazione per la troponina cardiaca T

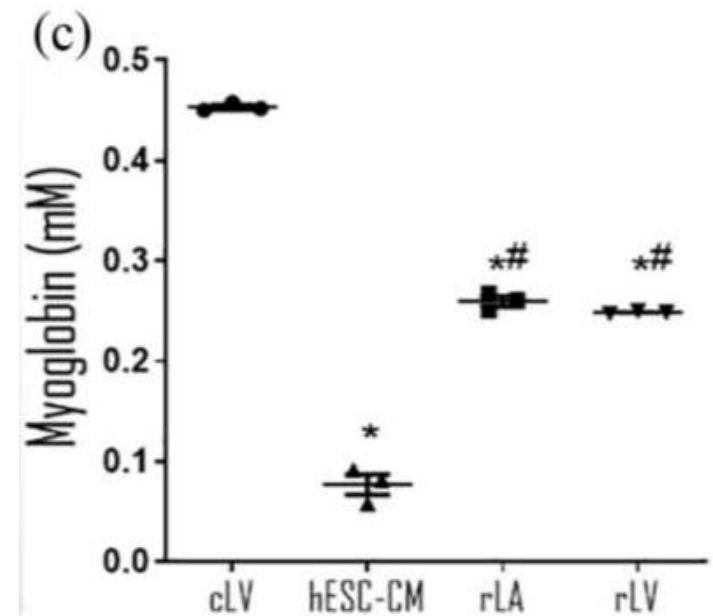
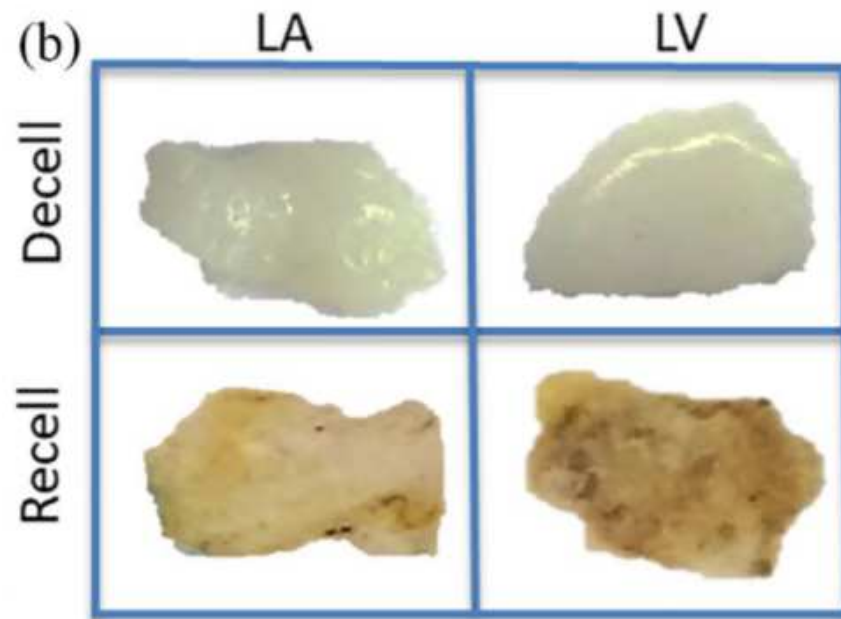




4. MATURAZIONE CARDIOMIOCITI

➔ 4.1 Quantificazione della mioglobina

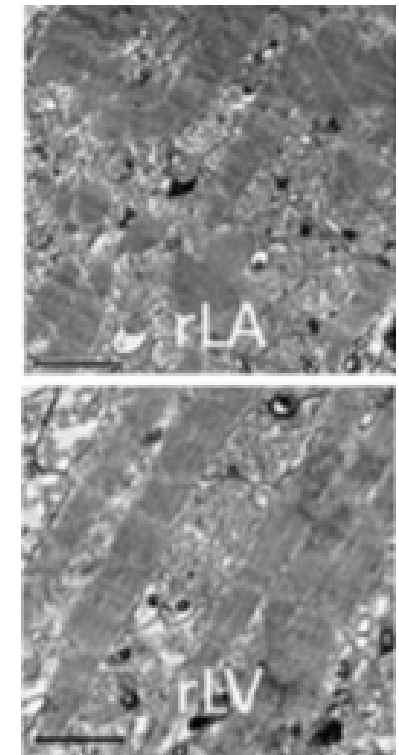
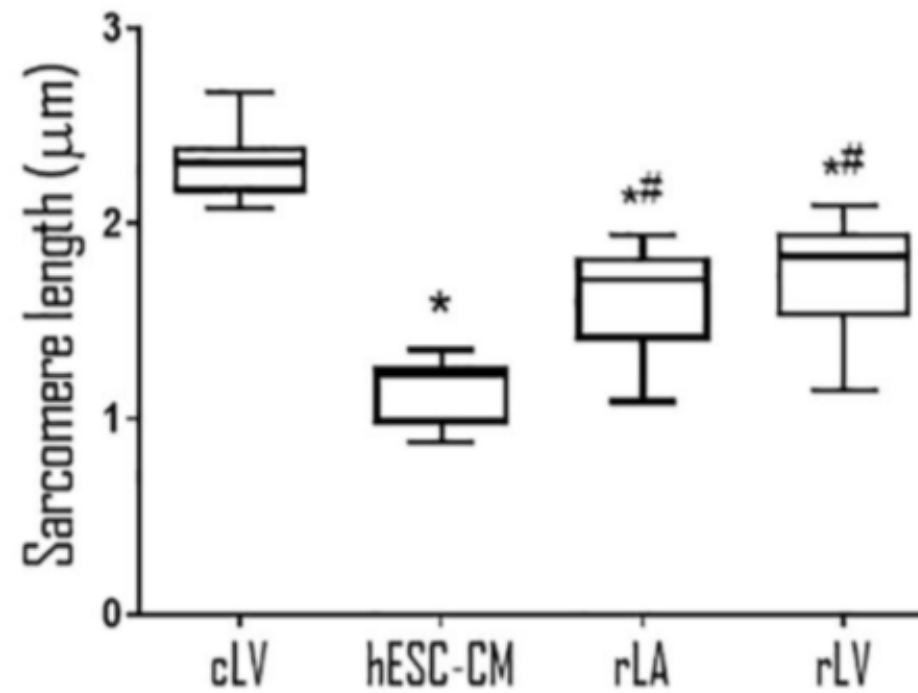
- La mioglobina è stata misurata utilizzando il **kit ELISA** per la mioglobina umana
- L'assorbanza è stata letta a 450 nm utilizzando un lettore di piastre, i livelli di mioglobina nell'rLA e nell'rLV erano circa il 57% e il 55%





➔ 4.2 Lunghezza sarcomero

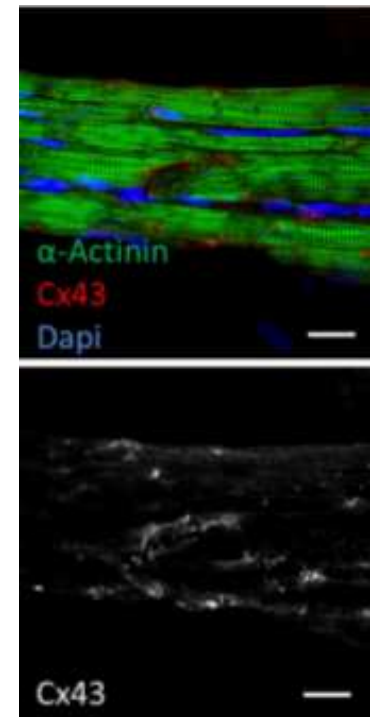
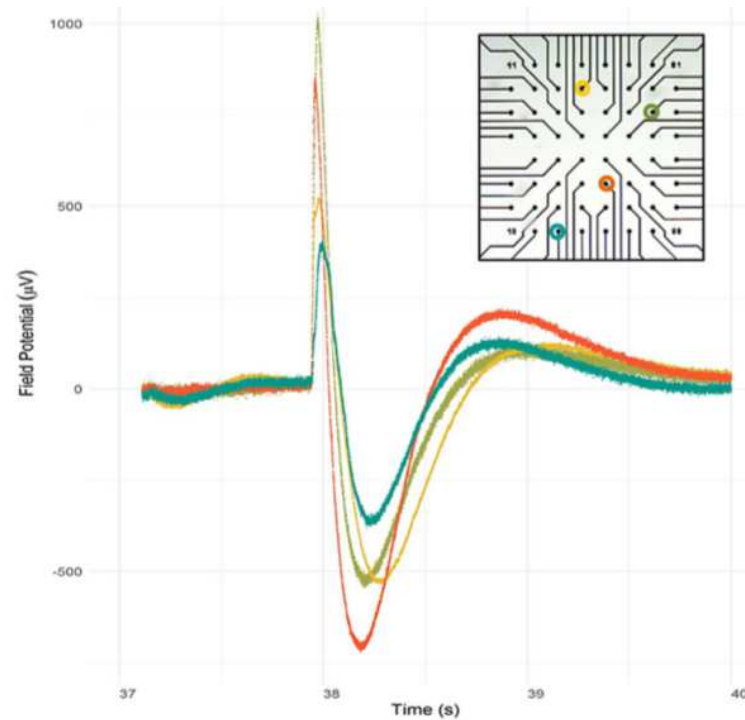
- La maturazione dei cardiomiociti è stata valutata utilizzando la microscopia a trasmissione (TEM)





➔ 4.3 Accoppiamento elettrico

- La valutazione delle proprietà elettriche, inclusa la propagazione delle onde del potenziale d'azione, è stata effettuata posizionando i tessuti in una camera di matrice di **microelettrodi a sei pozzetti (MEA)**





CONCLUSIONI

- Si è dimostrato che con l'efficienza di cellularizzazione, i cardiomiociti maturano e sincronizzano l'attività elettrica e le proprietà meccaniche/ biochimiche dei tessuti migliorano rispetto a quelle del tessuto nativo
- Questa è la prima volta in cui si è dimostrato che le cellule si incorporano nella membrana basale della matrice extracellulare piuttosto che rimanere confinate al punto di iniezione cellulare, infatti quando le cellule sono circondate dalla membrana basale cardiaca, la **reciprocità dinamica** tra le cellule e la matrice extracellulare, fornisce segnali biochimici e meccanici per indurre la maturazione dei cardiomiociti ma non solo, consente anche di variare la composizione e la struttura dell'ECM in risposta all'attività metabolica delle cellule residenti
- Dai risultati si è ottenuto a livello della dECM ricellularizzata un contenuto mioglobinico di ~ 60% e la lunghezza del sarcomero > 45%
- Gli scaffold ECM di ratto non sono adeguati per l'uso negli esseri umani, pertanto lo studio mira ad essere una base concreta per i successivi studi che proseguiranno in questa direzione