



Università Politecnica delle Marche

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

**«Generazione in vitro di organoidi cardiaci murini funzionali in presenza di FGF4 e componenti della matrice extracellulare»**

**«In vitro generation of functional murine heart organoids via FGF4 and extracellular matrix»**

Tesi di Laurea di:  
Margherita Carrino

Relatore:  
Prof.ssa Oliana Carnevali

Sessione Autunnale  
Anno Accademico  
2020/2021

# INTRODUZIONE



**ORGANOIDE**



**Proliferazione di  
cellule staminali**



- **MUSCOLO  
CARDIACO**

- **MUSCOLO  
LISCIO**

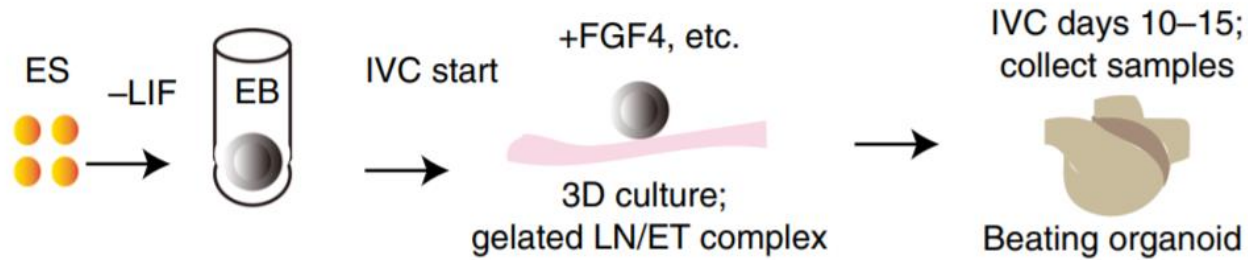


- **TESSUTO  
CONNETTIVO**

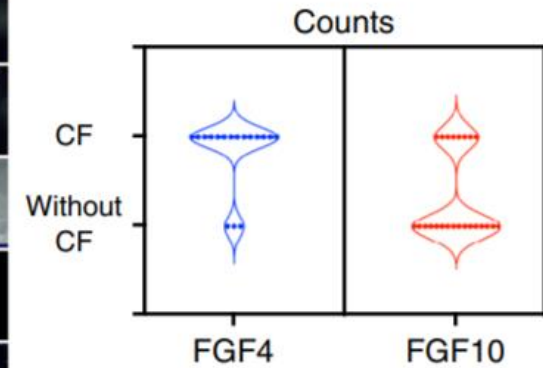
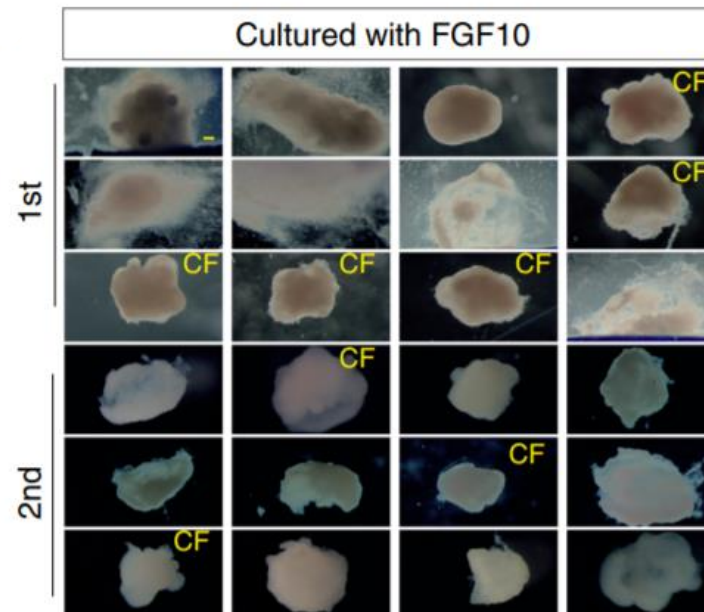
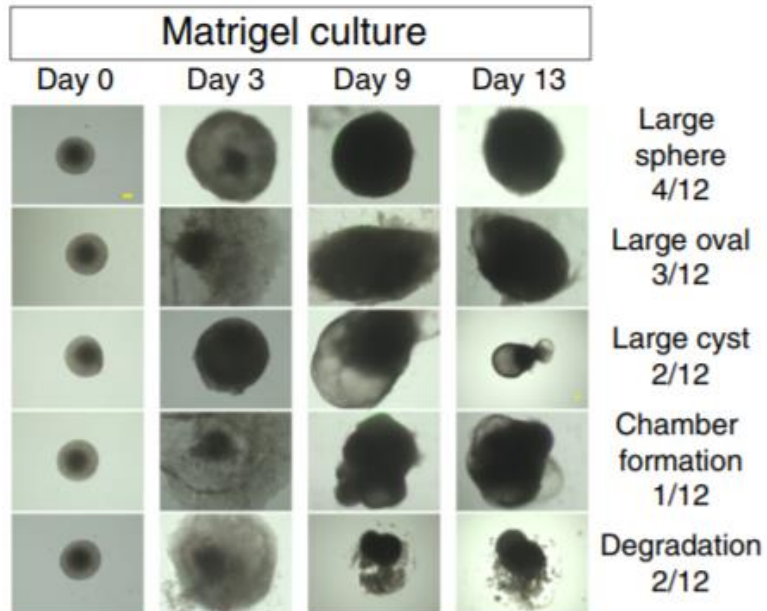
- **CELLULE  
ENDOTELIALI**

# FGF4 E COMPLESSO LN/ET PROMUOVONO LA GENERAZIONE DELL'ORGANOIDE

È importante verificare quali siano i fattori minimi di crescita per promuovere la cardiogenesi



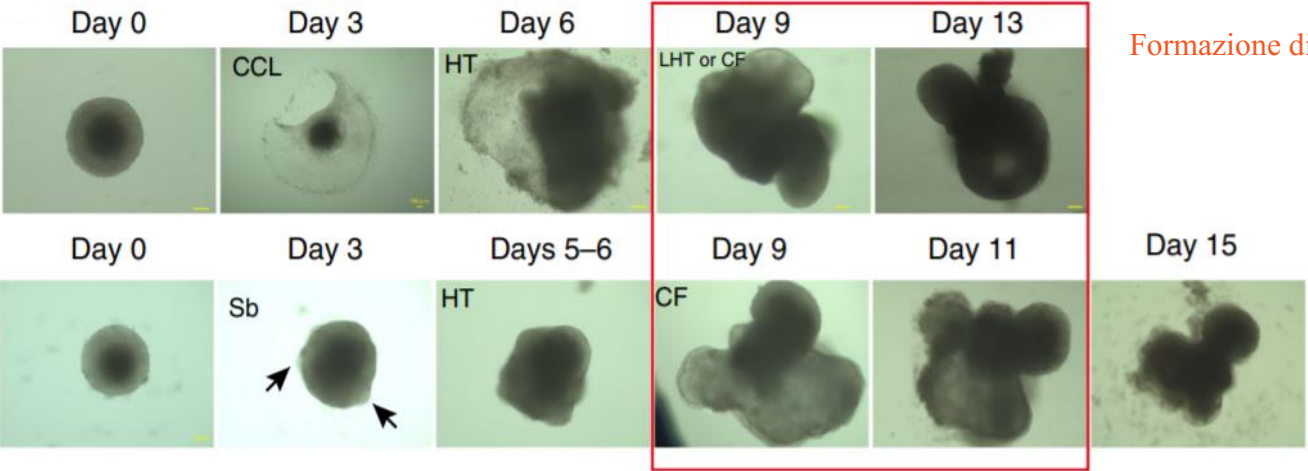
La quantità di cellule staminali è fondamentale!



L'impiego di FGF10 non sempre consente la formazione di atri e ventricoli.

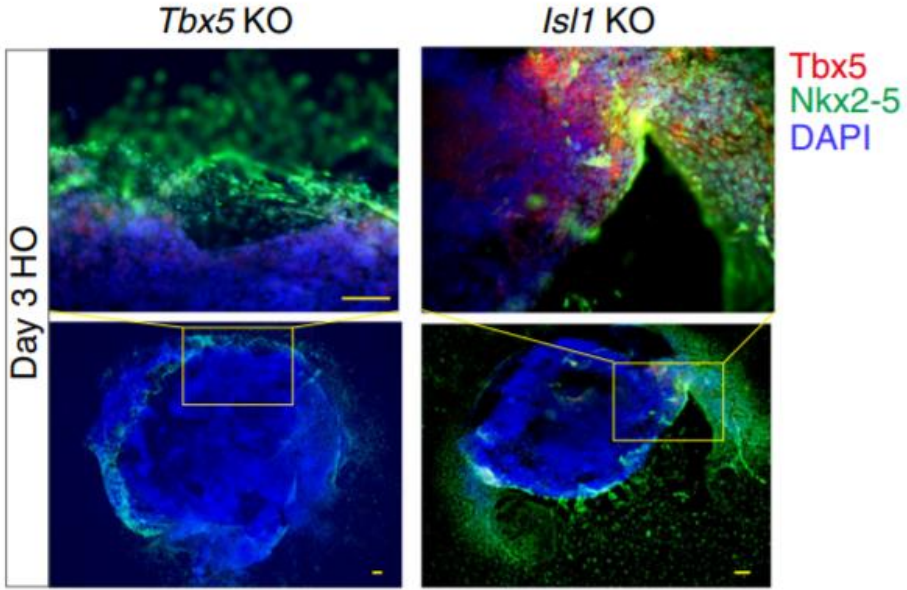
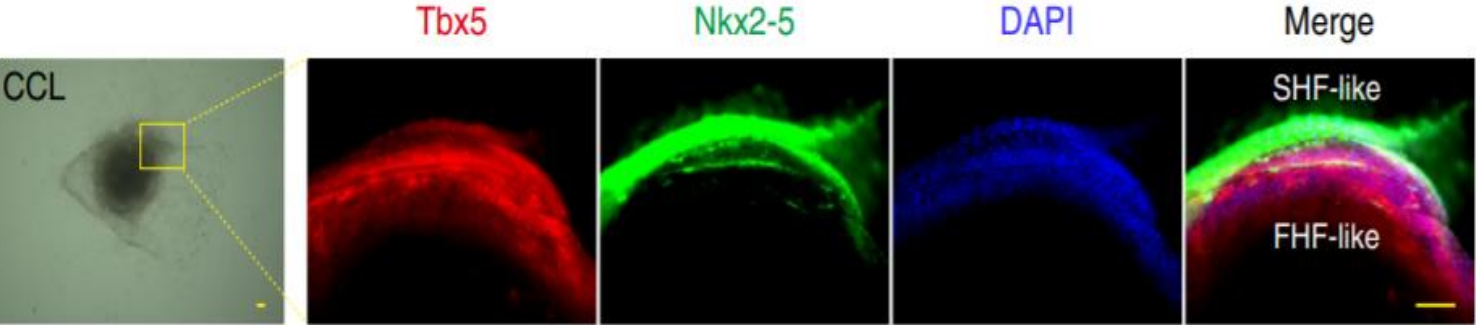


# CAMBIAMENTI MORFOLOGICI IN CARDIOGENESI



Formazione di atri e ventricoli

La visualizzazione dei fattori *Tbx5* e *Nkx2-5*, marcatori specifici dei campi cardiaci primario (FHF) e secondario (SHF), ha confermato che l'organoide mima lo sviluppo di un cuore embrionale già dai primi giorni.

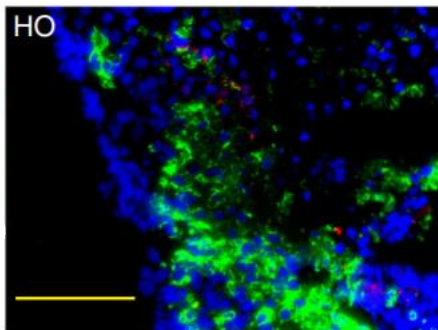


*Isl1* è fondamentale affinché SHF si formi correttamente.

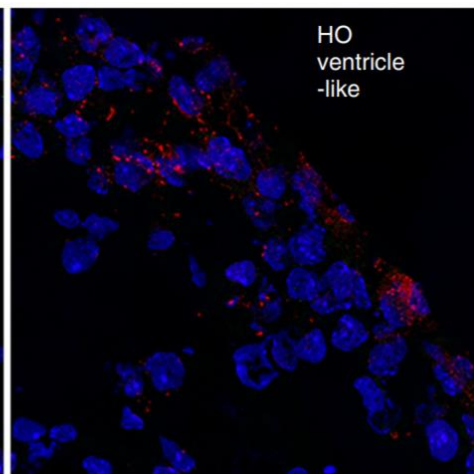
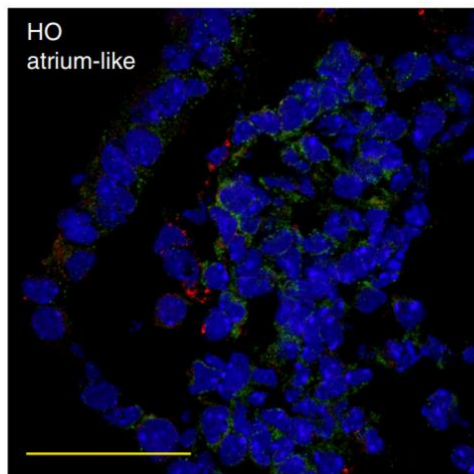
# VALUTAZIONE DI COMPONENTI CELLULARI

Gli organoidi presentano le stesse caratteristiche strutturali, citologiche ed istologiche, di un cuore embrionale.

cTnT/ $\alpha$ SMA

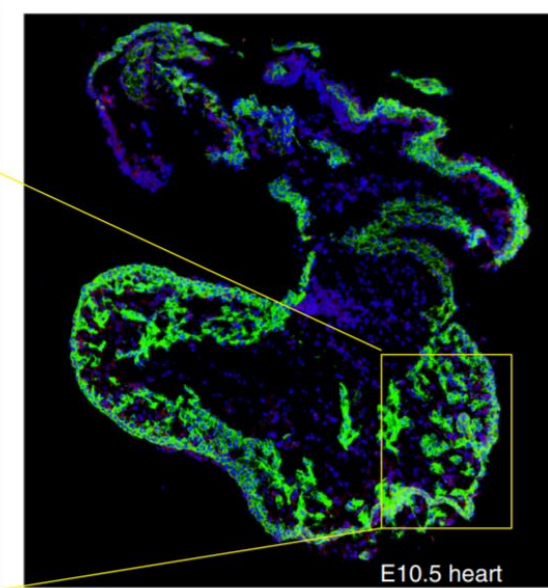
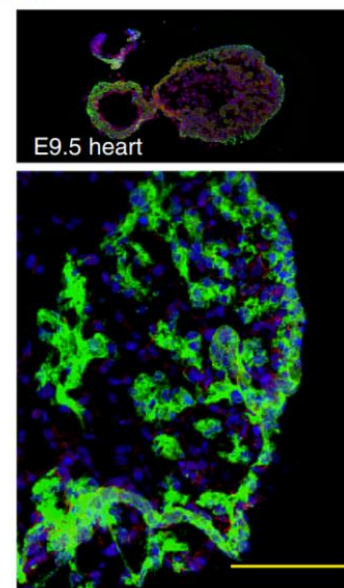
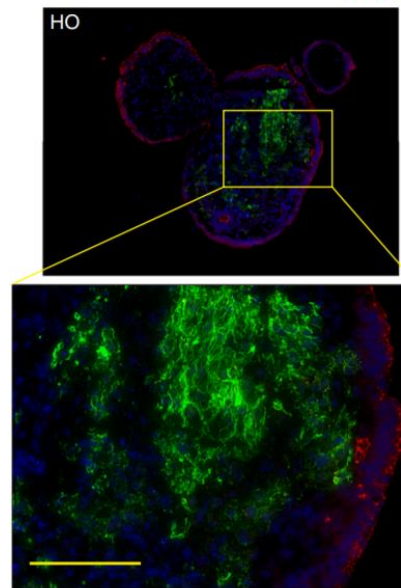


cTnT  $\rightarrow$  cardiomiociti  
 $\alpha$ SMA  $\rightarrow$  muscolo liscio



Cx43  $\rightarrow$  atrio e ventricolo  
Cx40  $\rightarrow$  ventricolo

TRPM4/cTnT

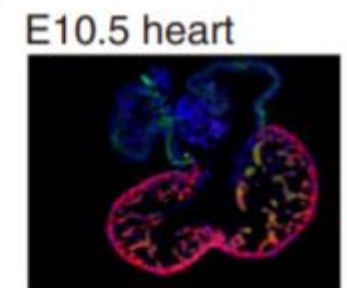
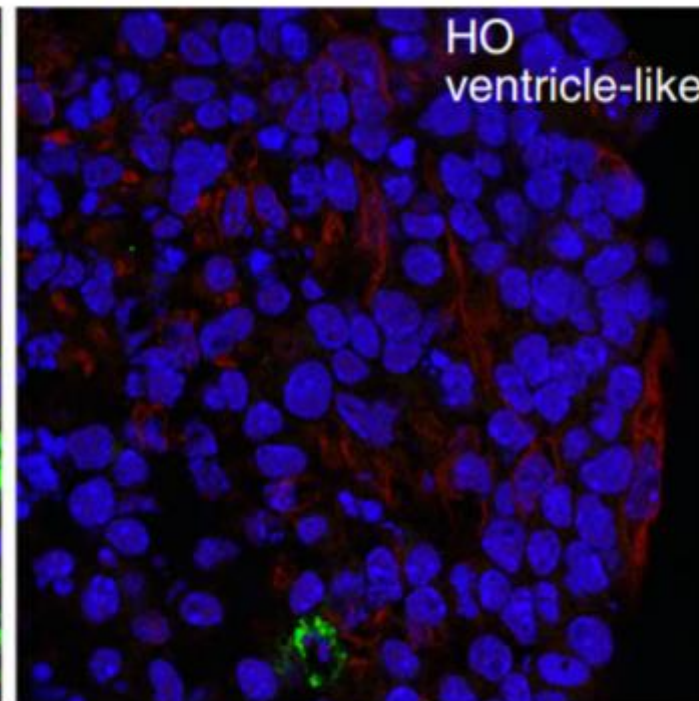
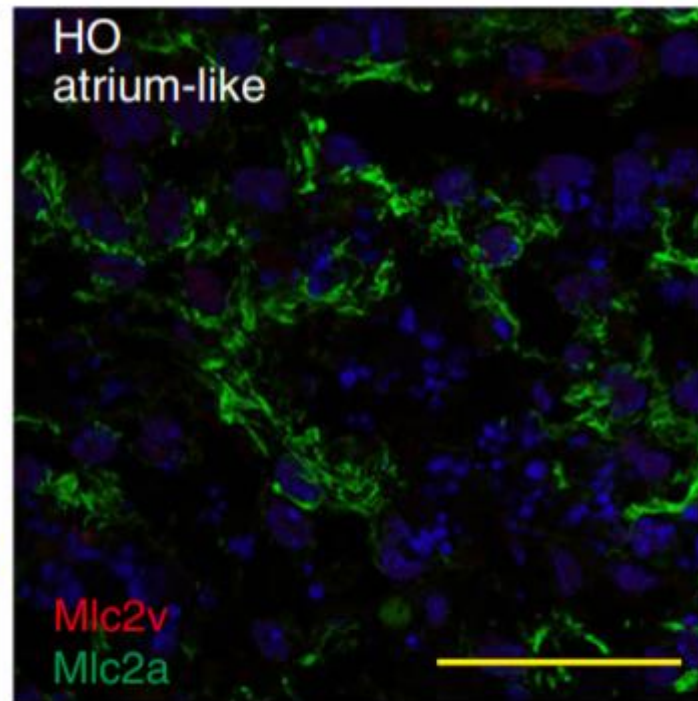
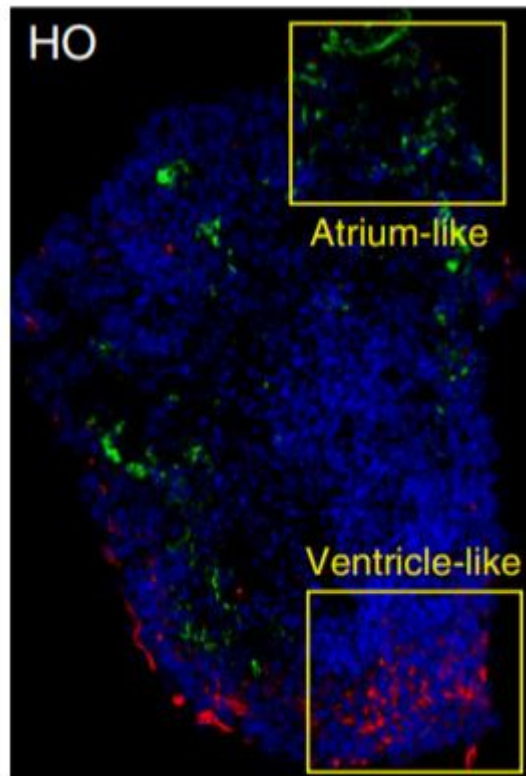


TRMP4  $\rightarrow$  fibre del Purkinje

Cx43/Cx40

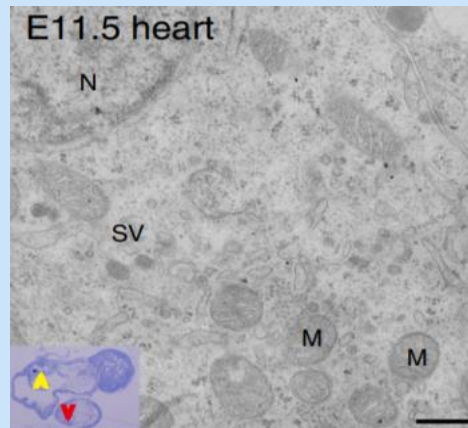


# ATRI E VENTRICOLI NEGLI ORGANOIDI



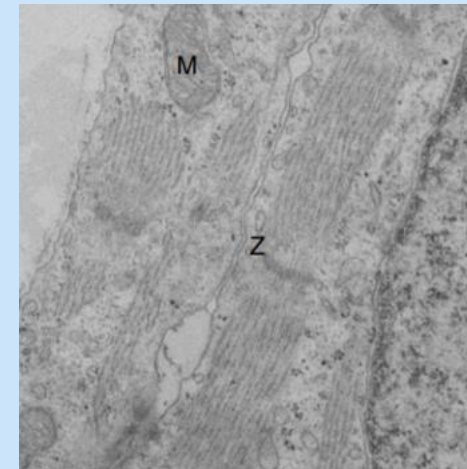
## Simil-**ATRIO**

- ✓ Contrazioni più veloci
- ✓ Maggior quantità di organelli e granuli
- ✓ Prominenti complessi del Golgi
- ✓ Numerosi reticoli sarcoplasmatici
- ✓ Elevata quantità di mitocondri



## Simil-**VENTRICOLO**

- ✓ Sarcomeri con bande ben strutturate e miofibrille contenenti glicogeno

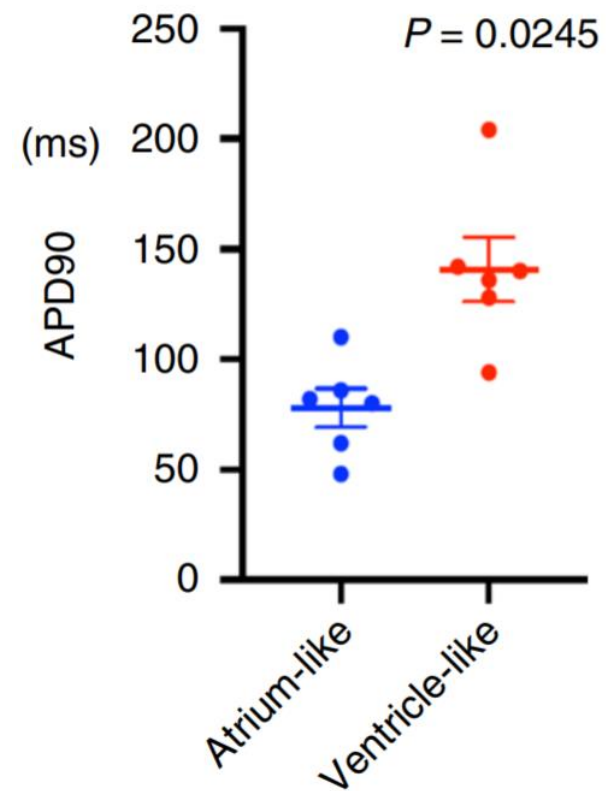
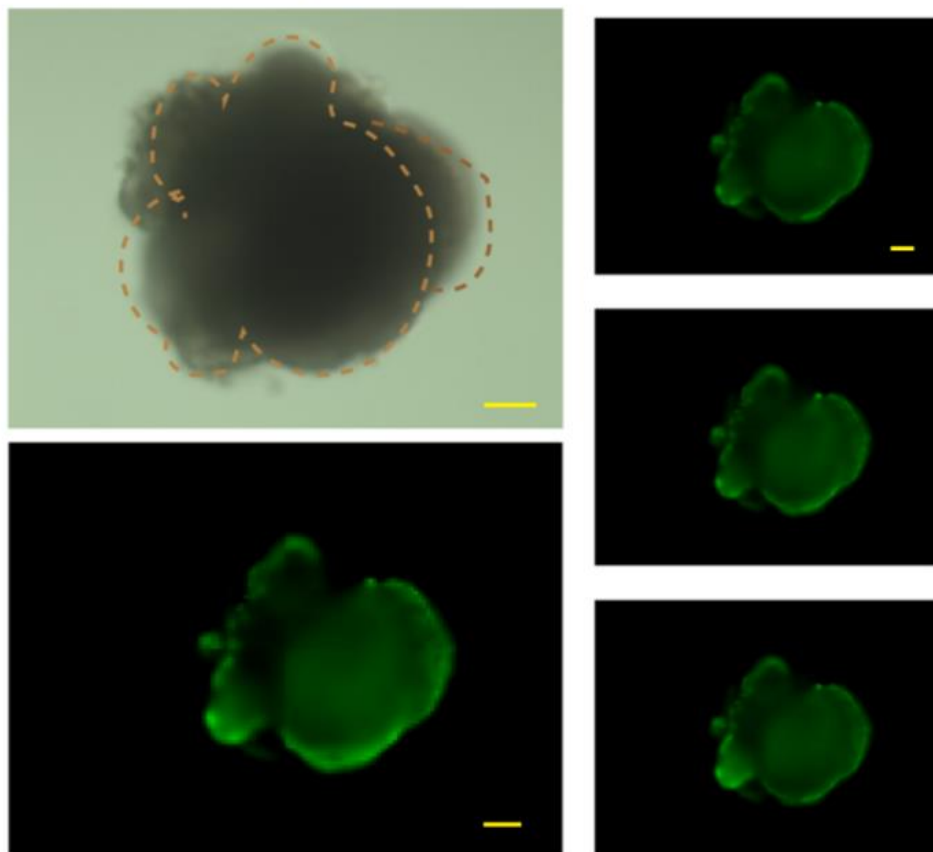




# CAPACITA' FUNZIONALI DEGLI ORGANOIDI

Ca<sup>2+</sup>

HO day 12



# DISCUSSIONE



# CONCLUSIONE

Caratteristiche strutturali che riportano alle analoghe componenti embrionali

- Specifica organizzazione muscolare
- Associazione tra tubulo T e cardiomiociti
- Fibre del Purkinjie
- Oscillazioni periodiche di Ca<sup>2+</sup>

# SITOGRAFIA

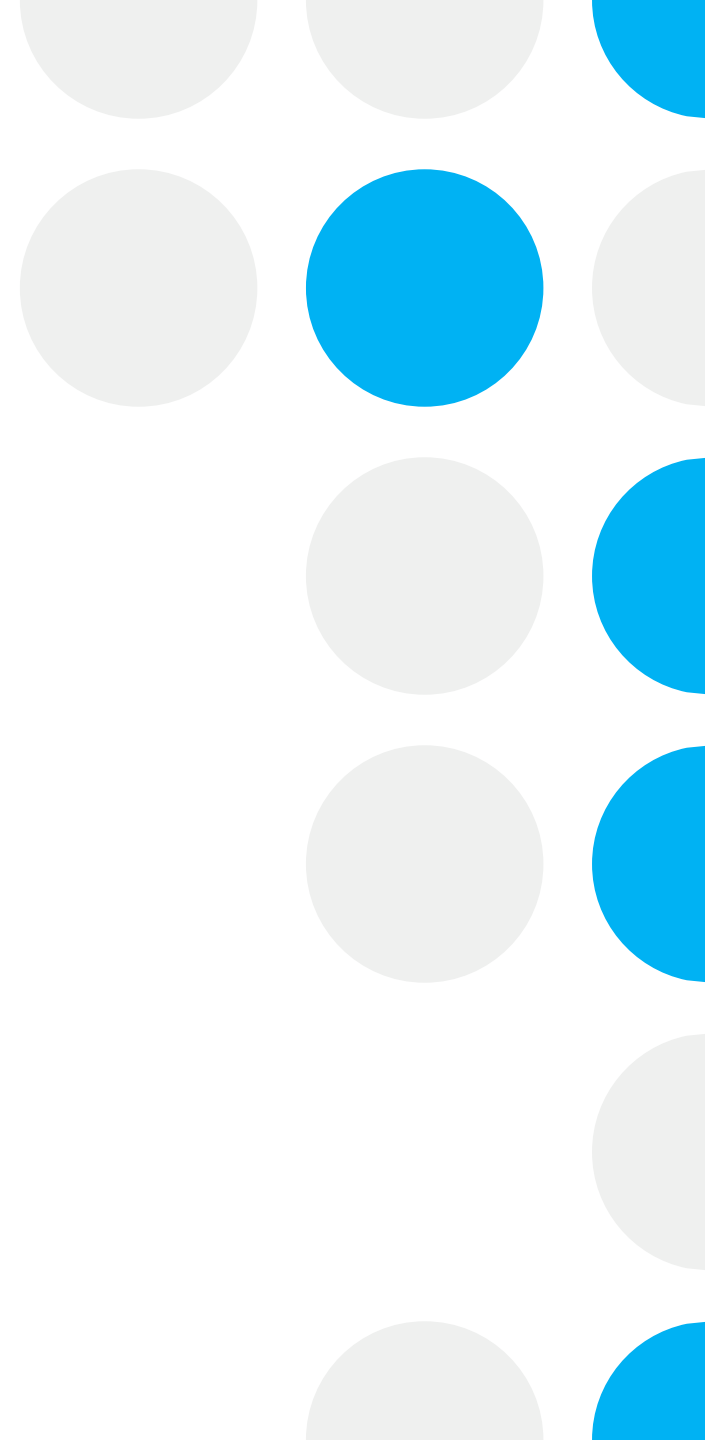
Logo: <https://www.salonedellostudente.it/atenei/universita-politecnica-delle-marche/>

Modello murino: <https://www.drugtargetreview.com/news/61428/procedure-developed-to-create-murine-models-of-covid-19-for-testing-of-therapeutics-and-vaccines/>

Video: <https://www.eurekalert.org/multimedia/647070>

Organoidi: <https://lab-a-porter.com/2020/03/organoids-mini-organs-in-a-dish/>

Altre immagini: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-18031-5>



# RIASSUNTO

Lo sviluppo delle strutture cardiache è da sempre considerato un processo molto complesso, soprattutto da riprodurre *in vitro*.

A questo proposito ricercatori della Tokyo Medical and Dental University hanno sviluppato organoidi tridimensionali funzionali in laboratorio molto somiglianti ad un cuore in via di sviluppo, partendo da una coltura di cellule embrionali pluripotenti di murino. Questi organoidi consistono di molteplici strati di tessuto caratterizzati da tipi differenti di cellule inclusi muscoli funzionanti e cellule di tessuto connettivo che, insieme ad una corretta formazione delle giunzioni intracellulari, permettono una giusta propagazione degli impulsi nervosi. È stato quindi osservato che tali componenti vanno a costituire insieme un adeguato sistema funzionale che potrebbe rappresentare una svolta nel campo della medicina rigenerativa e per quanto riguarda i test di nuovi farmaci, offrendo un modello di visualizzazione di possibili effetti collaterali a livello cardiaco.

Per raggiungere questo obiettivo gli scienziati hanno esaminato i fattori coinvolti nello sviluppo embrionale, ipotizzando che il fattore di crescita 4 dei fibroblasti (FGF4) ed un complesso costituito dalle proteine laminina ed entactina (LN/ET) fossero sufficienti ad organizzare strutture cardiache simili a quelle sviluppate *in vivo*. Difatti, è stato osservato che cellule staminali esposte a questi fattori hanno mostrato notevoli somiglianze, in termini organizzativi, con il cuore in via di sviluppo sulla base di analisi strutturali e molecolari: le componenti cellulari si presentano ben organizzate in termini strutturali e funzionali così da portare ad attendibili capacità funzionali. Si può quindi concludere che il processo di differenziamento dell'organoide riflette i cambiamenti morfologici che avvengono durante lo sviluppo di un cuore embrionale.