



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

**Corso di laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE**

**EFFETTO DEL FUMO DI SIGARETTA SUL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI IN CELLULE CARDIACHE  
EFFECTS OF CIGARETTE SMOKE COMPONENTS ON MYOCARDIAL DIFFERENTIATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS**

**Tesi di Laurea di:  
Beatrice Papa**

**Docente Referente  
Chiar.mo Prof.ssa  
Francesca Maradonna**

**Sessione di Laurea straordinaria: Febbraio 2020  
Anno Accademico: 2018/1019**

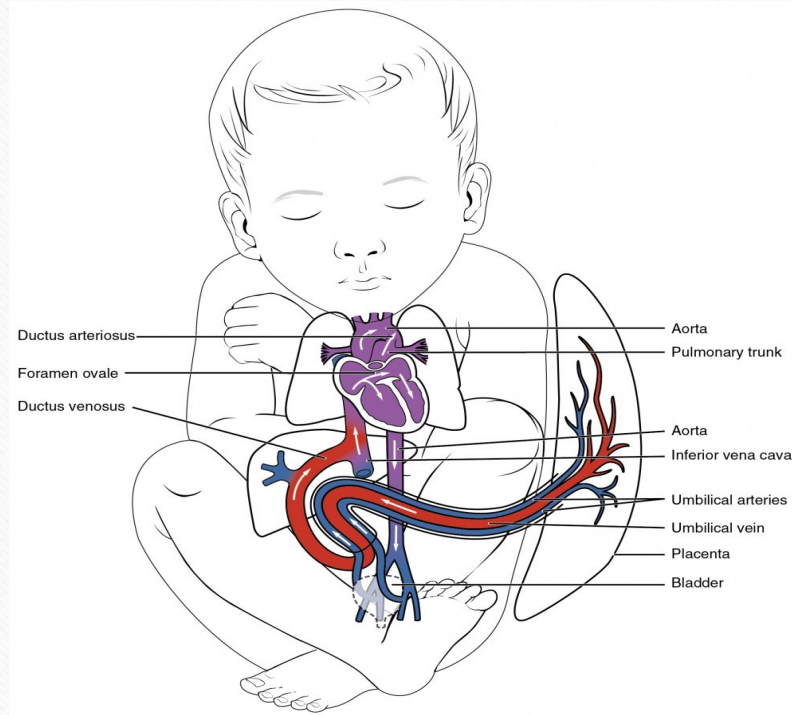
# INTRODUZIONE

---

1. EFFETTI DEL FUMO NEL CUORE DEL FETO
2. MATERIALI E METODI
3. RISULTATI
4. CONCLUSIONI

# 1) EFFETTI DEL FUMO NEL CUORE DEL FETO

---



## 2) MATERIALI E METODI

---

- **ESTRATTI DI SIGARETTA (CSE) E NICOTINA**

CSE:

- **Sigaretta di riferimento(3R4F)**

NICOTINA:

- **Ottenuta dal CSE e quantificata attraverso l'uso di un gascromatografo ed uno spettrometro di massa.**

Concentrazione media Nicotina( $\mu\text{M}$ )	Quantità media CSE(%)
0	0
0.6	0.042
3.0	0.210
5.4	0.378
7.8	0.546

\* Quantità di CSE aggiunta in base alla concentrazione di Nicotina.



- **PREPARAZIONE FIBROBLASTI EMBRIONALI DI TOPO**

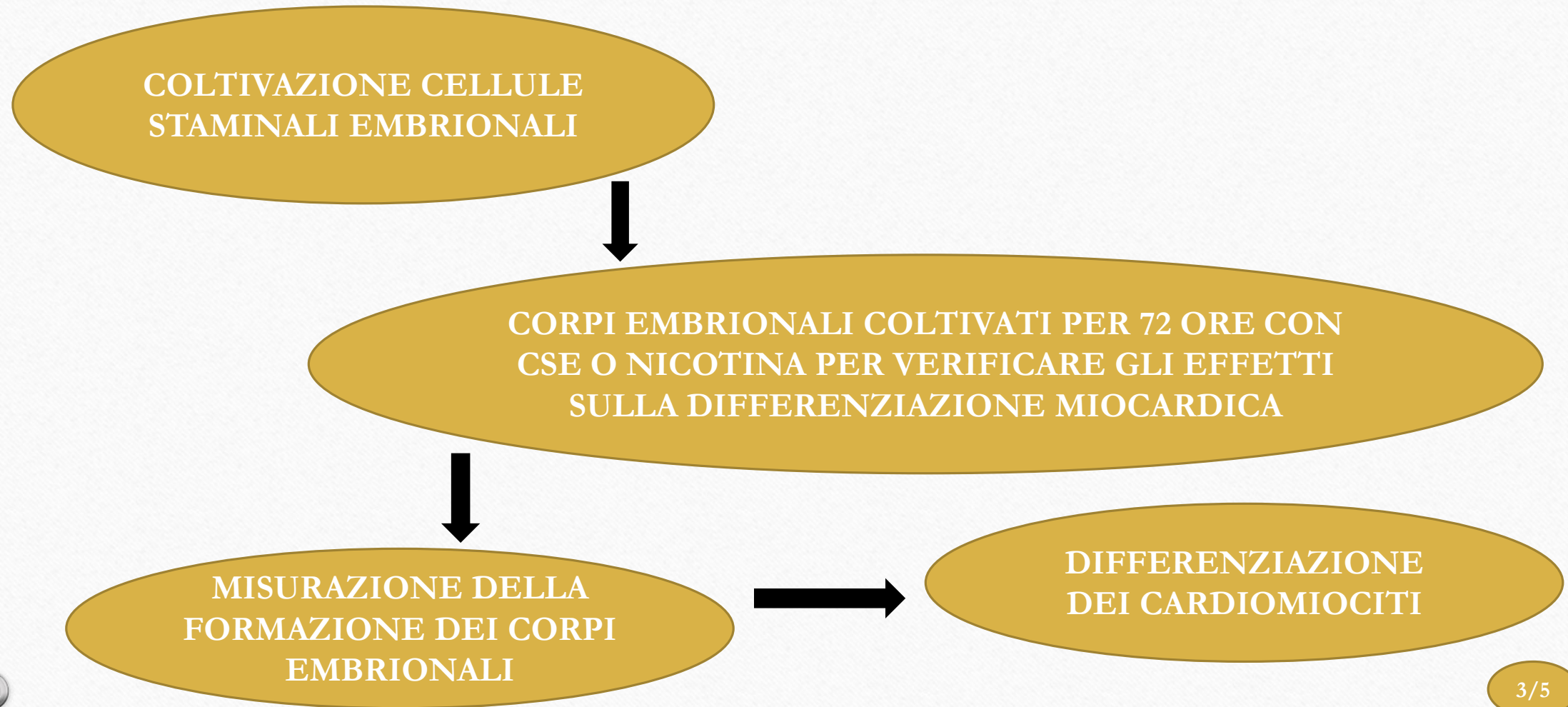
Fibroblasti utilizzati come substrati di alimentazione per mantenere la pluripotenza delle cellule staminali embrionali e fornire una matrice cellulare per far crescere le cellule.

1) Preparazione e isolamento

2) Fibroblasti isolati:

- Inattivati precedentemente alla cultura delle cellule staminali embrionali con mitomicina C.
- Seminati come cellule primarie in capsula per cultura cellulare, coltivati e conservati.

- **TERRENO DI COLTURA DELLE CELLULE E FORMAZIONE DEI CORPI EMBRIONALI DI TOPO**



- ❖ Corpi embrionali e cardiomiociti, che si differenziano ogni giorno, vengono coltivati per un massimo di 17 per determinare gli effetti dell'esposizione a lungo termine a CSE e nicotina.
- ❖ Dopo i quattro giorni successivi alla differenziazione dei cardiomiociti inizia la contrazione del miocardio.



- MISURAZIONE DEL RAPPORTO DEL BATTITO E DELLA FREQUENZA DEL BATTITO:

- Rapporto di battito: Tra tutti i cardiomiociti e quelli contraenti
- Frequenza di battito: In ogni cardiomiocita contraente per 20 secondi

## • WESTERN BLOT

Antigene	Cavia	Diluizione	Produttore
Ciclina D1	Topo	1:3000	Abcam
P53	Topo	1:1000	Abcam
HDAC1	Topo	1:1000	Santa Cruz
HDAC2	Topo	1:500	Santa Cruz
HAND1	Topo	1:500	Novus B.
NOTCH1	Topo	1:500	Biolegend
P21	Coniglio	1:1000	Abcam
GATA4	Coniglio	1:500	Bioss
TBX5	Coniglio	1:1000	Abcam
NKX2-5	Coniglio	1:250	Bioss
Troponina I	Coniglio	1:250	Bioss
GAPDH	Topo	1:10000	Abcam

❖ Sei giorni dopo la differenziazione  
dei cardiomiociti



1) ESTRAZIONE PROTEINE

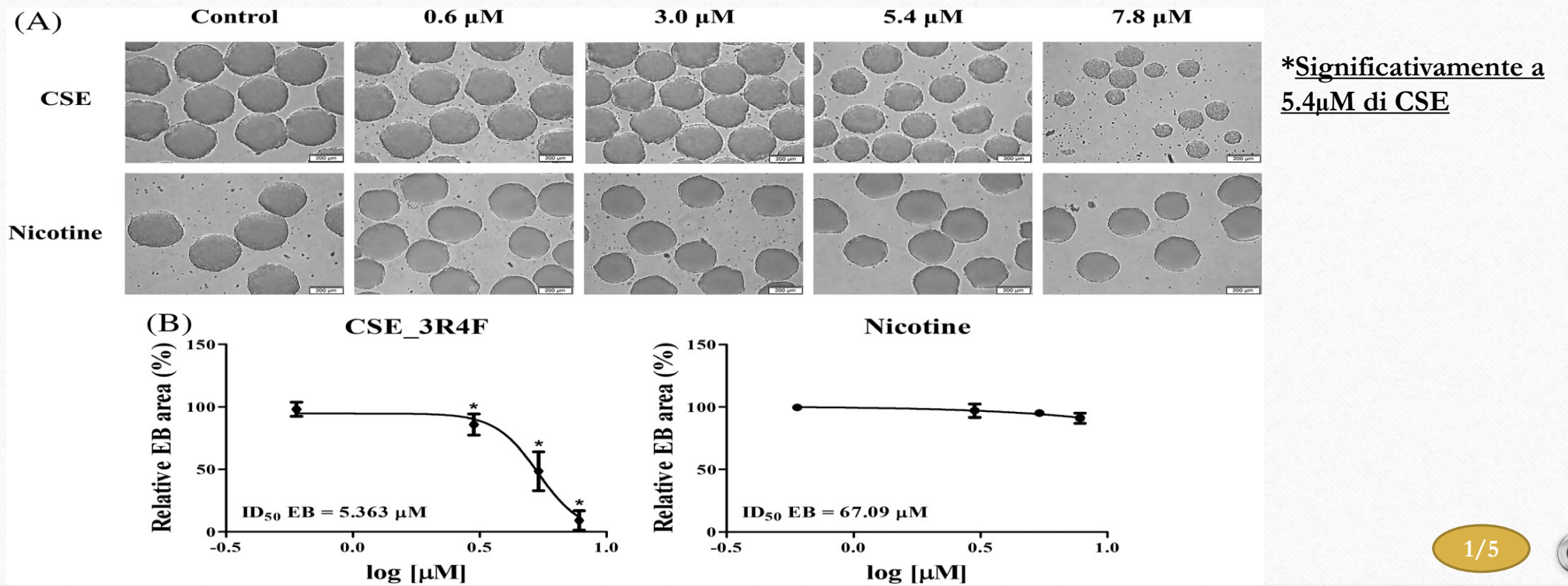


2) SEPARAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DI  
PROTEINE MEDIANTE IL RICONOSCIMENTO  
CON ANTICORPI SPECIFICI.

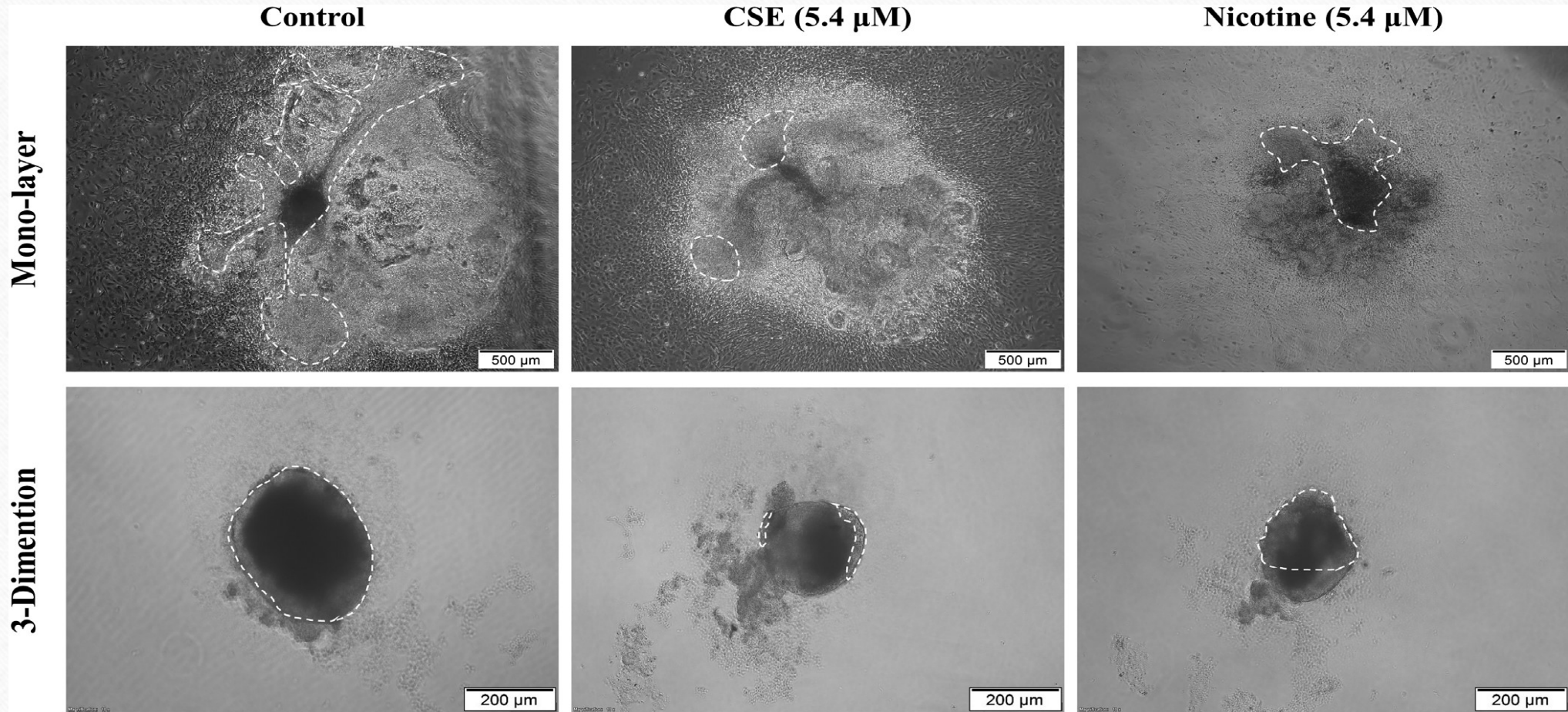


# 3) RISULTATI

- AL CONTRARIO DELLA NICOTINA, CSE RIDUCE LA TAGLIA DEI CORPI EMBRIONALI:

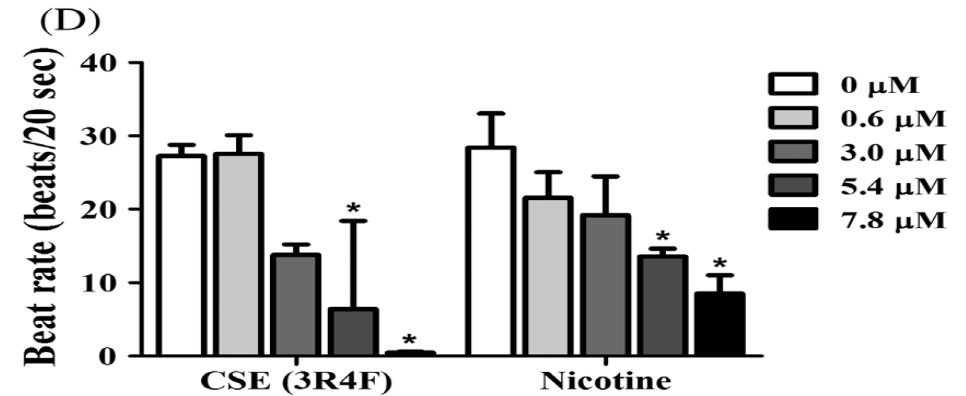
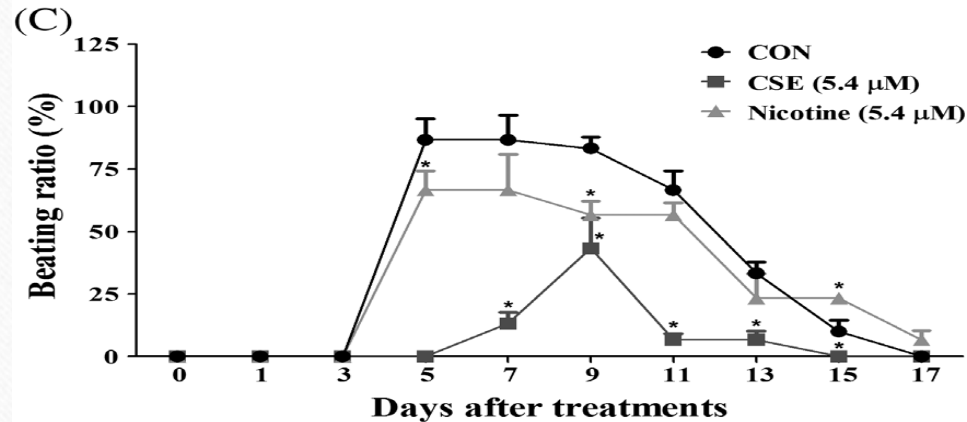
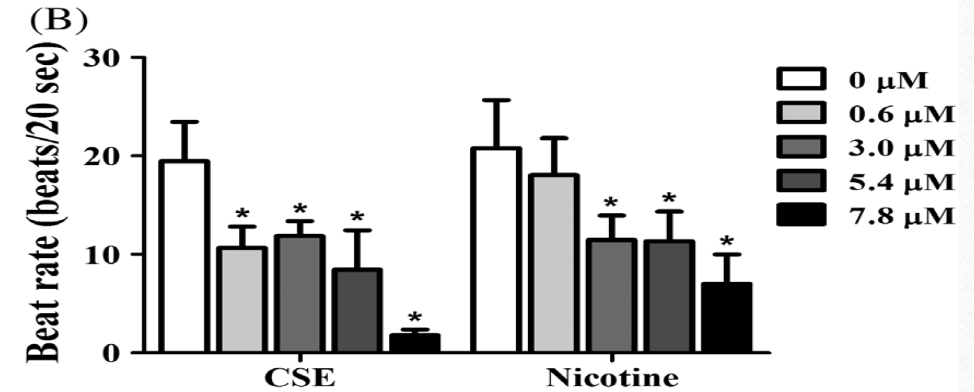
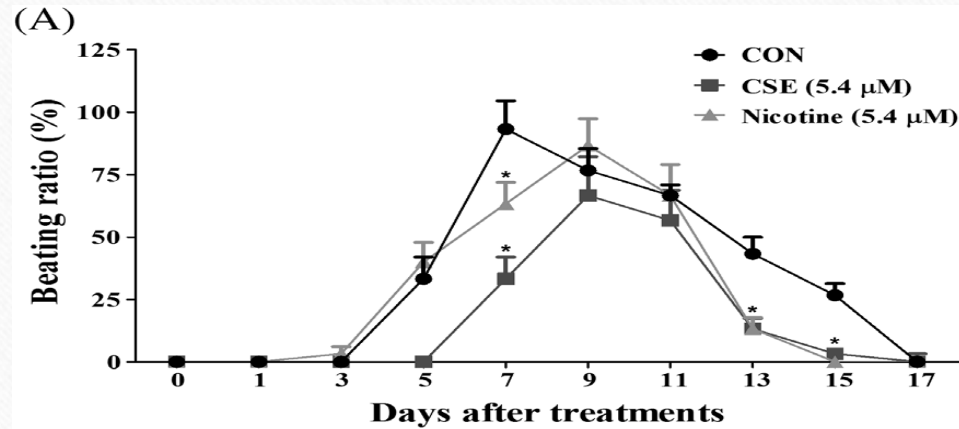


- ...INDUCONO CAMBIAMENTI MORFOLOGICI NELLA DIFFERENZIAZIONE DELLE CELLULE DEL MIOCARDIO...



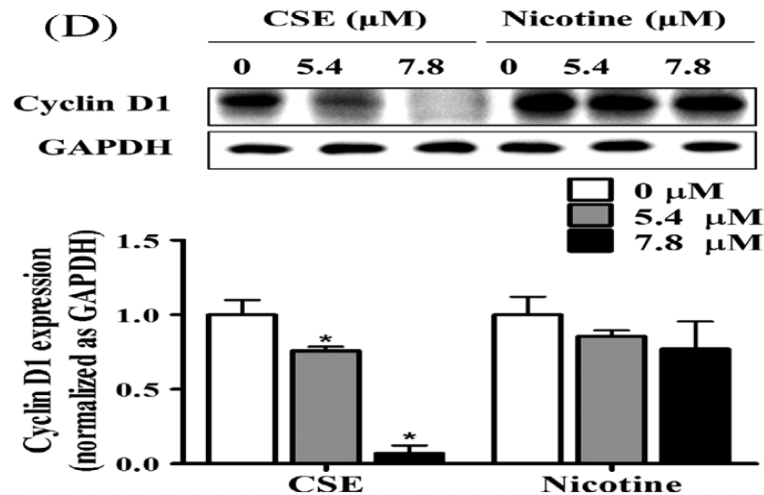
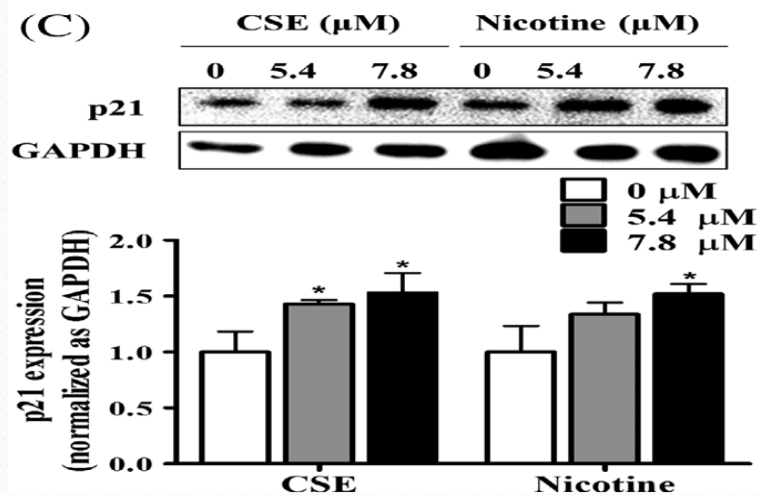
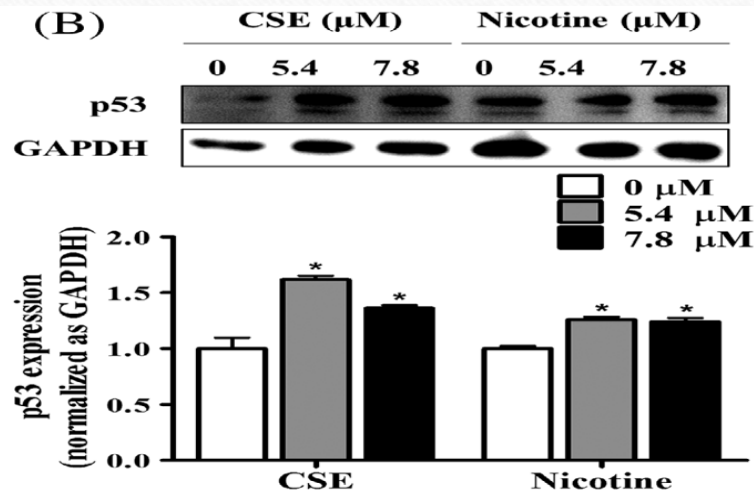
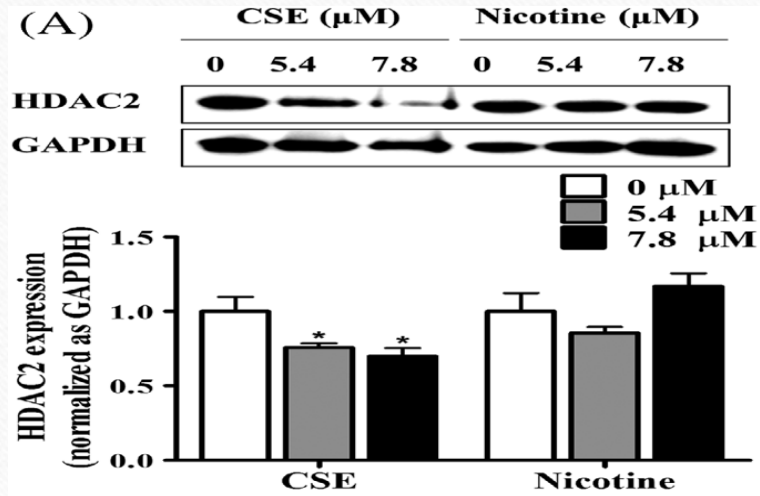


• ...RITARDANO LA DIFFERENZIAZIONE NEI CARDIOMIOCITI...



\*CSE e nicotina hanno un impatto maggiore sulla differenziazione miocardica delle cellule staminali rispetto alla dimensione dei corpi embrionali stessa

• CSE E NICOTINA INFLUENZANO L'ESPRESSIONE PROTEICA DEI GENI CORRELATI ALLA CRESCITA DEI CORPI EMBRIONALI

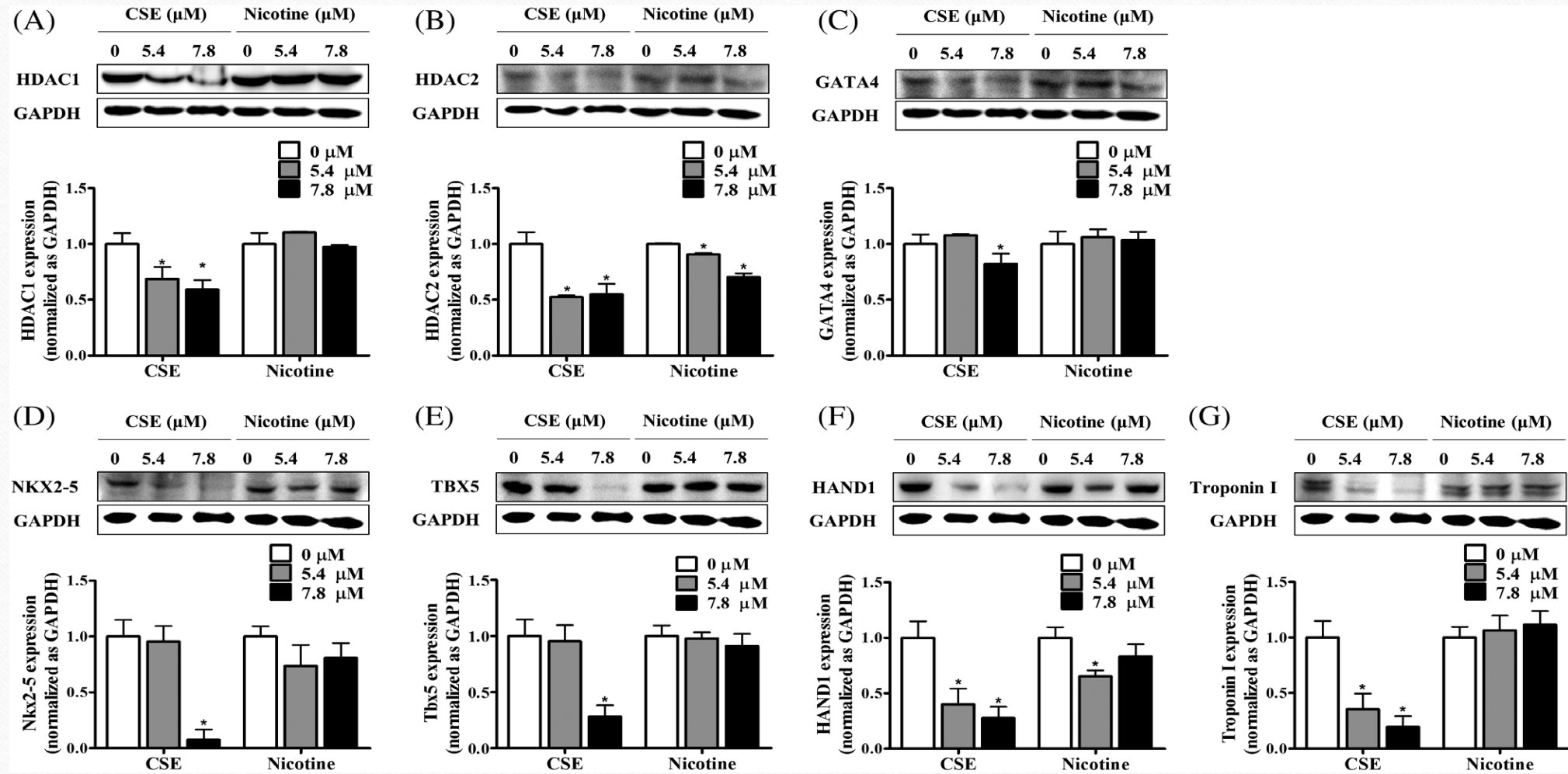


\*CSE ha ridotto l'espressione proteica di HDAC2 e ciclina D1 ma ha aumentato quella di p53 e p21

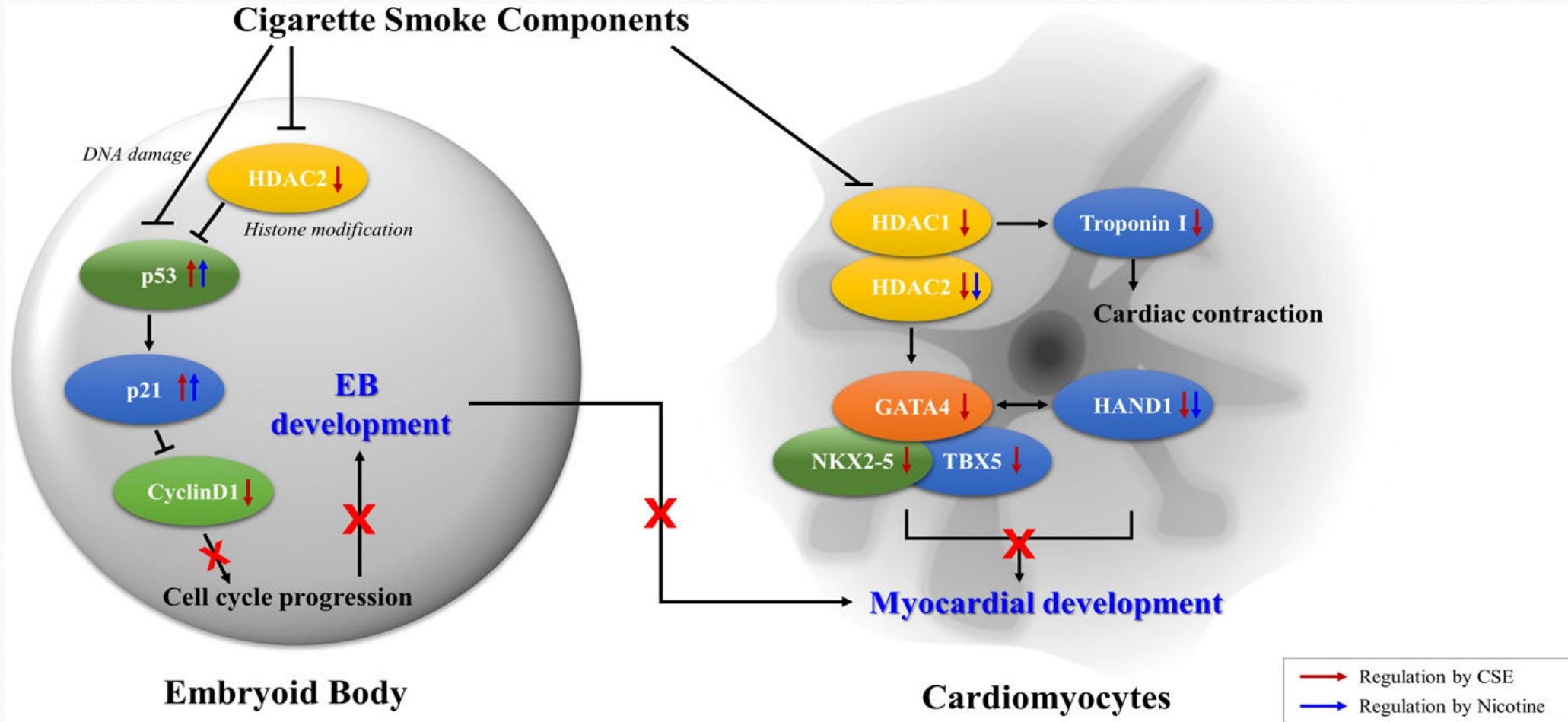
\*Nicotina ha ridotto l'espressione proteica di ciclina D1 e ha aumentato quella di p53 e p21



- ...DETERMINANO CAMBIAMENTI NELL'ESPRESSIONE PROTEICA CORRELATI ALLA DIFFERENZIAZIONE E ALLA FUNZIONE CARDIACA



- DAI PRECEDENTI RISULTATI SI DEDUCE CHE...



## 4) CONCLUSIONI

- ❖ Nicotina → Causa dipendenza ma viene utilizzata nei prodotti per smettere di fumare come cerotti o gomme perché si pensa abbia poca tossicità. Dai risultati di questo studio però si evince che essa presenta una tossicità per lo sviluppo che inibisce la differenziazione miocardica degli embrioni:
  - E' considerata un tossico cardiaco
  - Dovrebbe essere limitata nell'uso terapeutico
- ❖ CSE → Contiene migliaia di sostanze che possono essere intrinsecamente più tossiche della nicotina.



**COMPONENTI DEL FUMO, INCLUSA LA NICOTINA POSSONO CAUSARE DIFFERENZIAZIONE E SVILUPPO DEL MIOCARDIO ANORMALI, INOLTRE FUMARE IN GRAVIDANZA PUO' CAUSARE BASSO PESO ALLA NASCITA E OBESITA' IN ETA' ADULTA.**



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!!!**