



**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**

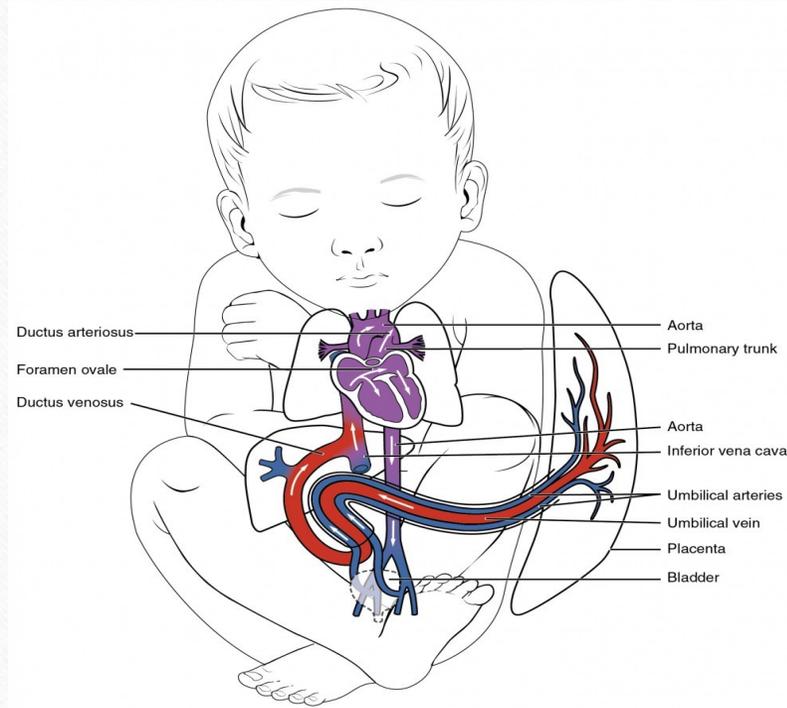
**Docente Referente
Chiar.mo Prof.ssa
Francesca Maradonna**

**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(μM)	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**

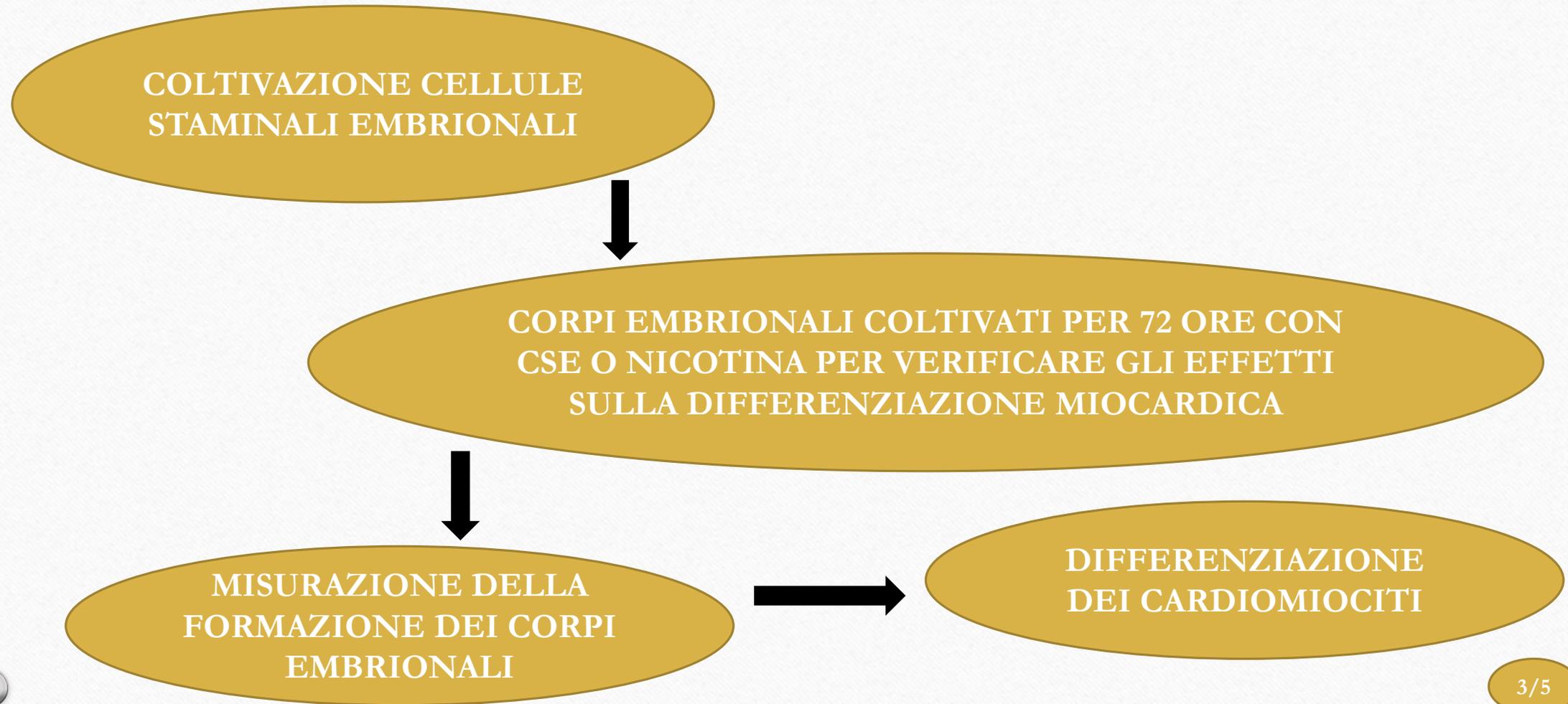
Fibroblasti utilizzati come substrati di alimentazione per mantenere la pluripotenza delle cellule staminali embrionali e fornire una matrice cellulare per far crescere le cellule.

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



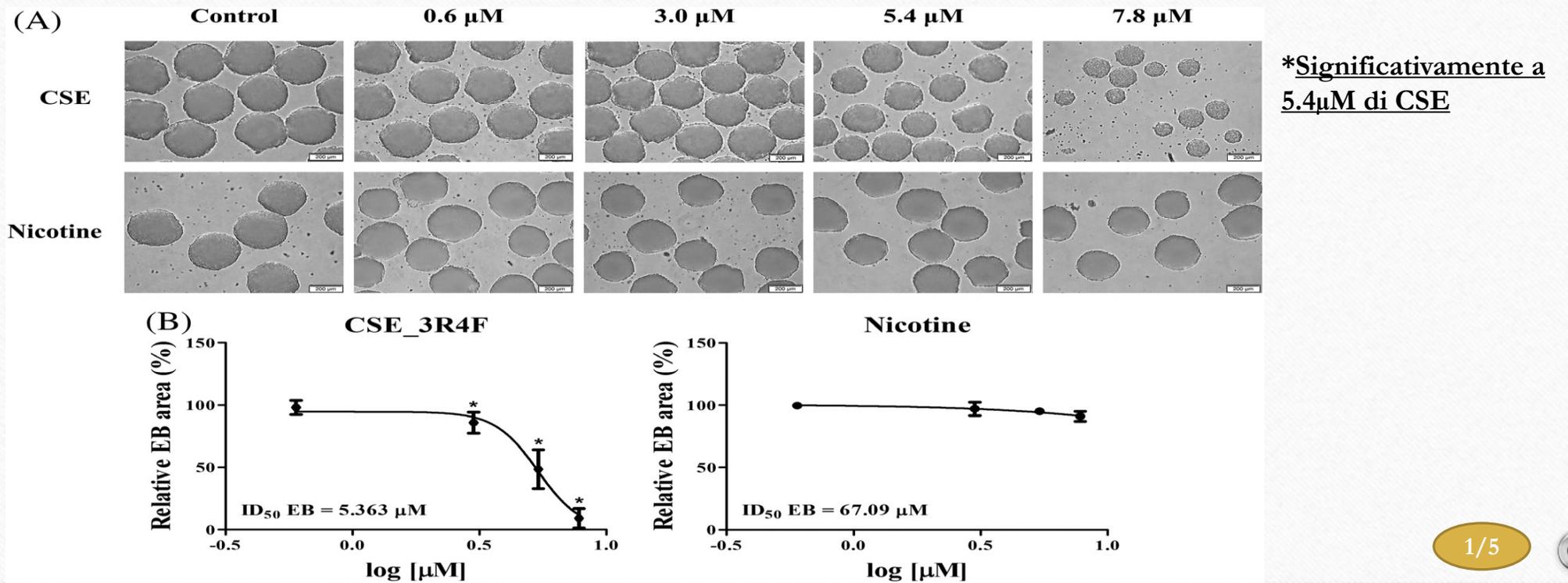
1) ESTRAZIONE PROTEINE



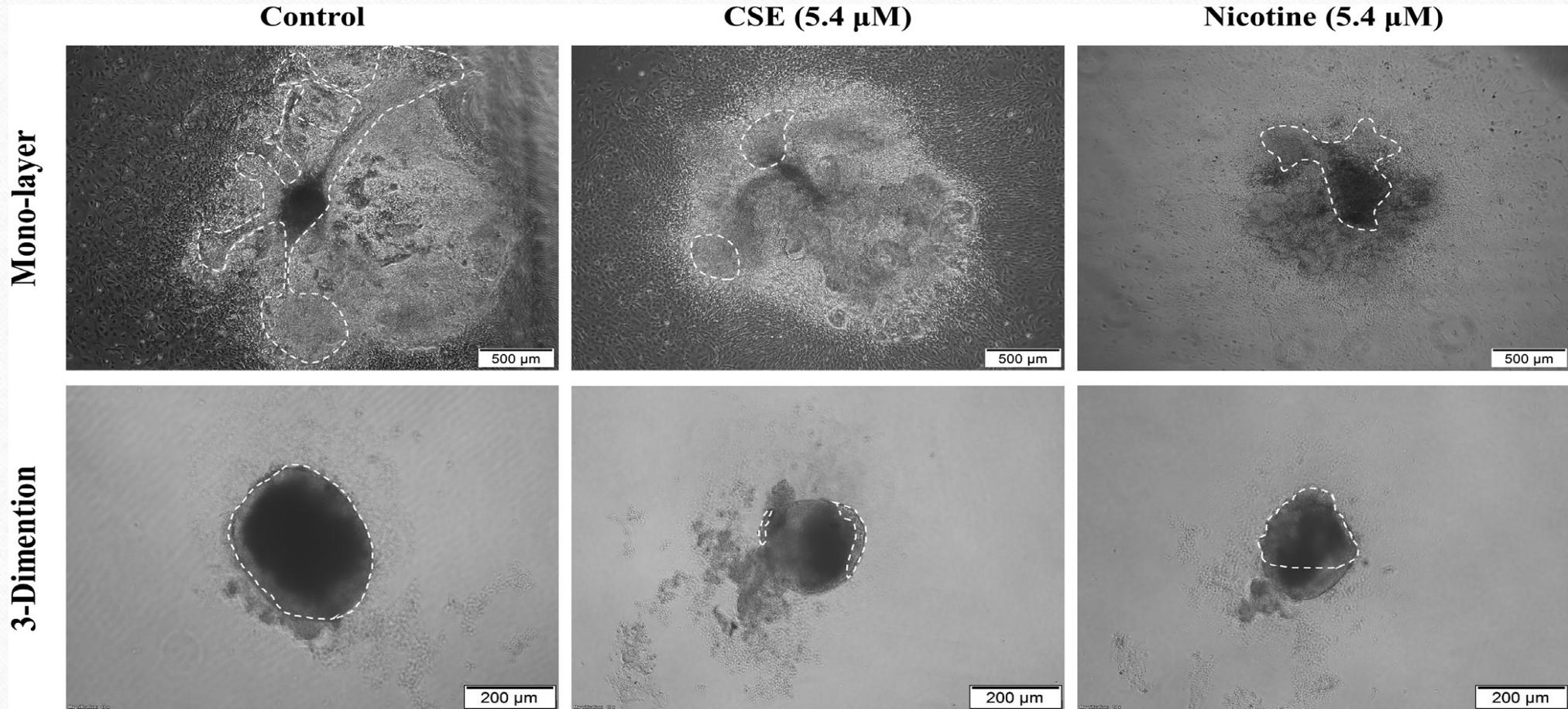
2) SEPARAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DI PROTEINE MEDIANTE IL RICONOSCIMENTO CON ANTICORPI SPECIFICI.

3) RISULTATI

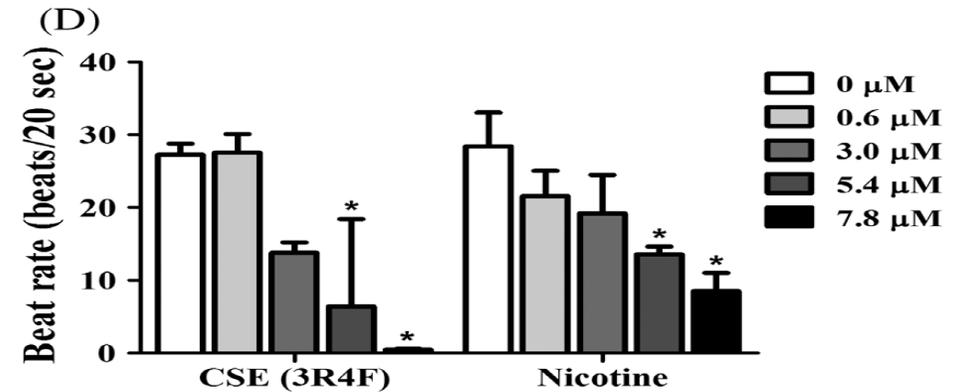
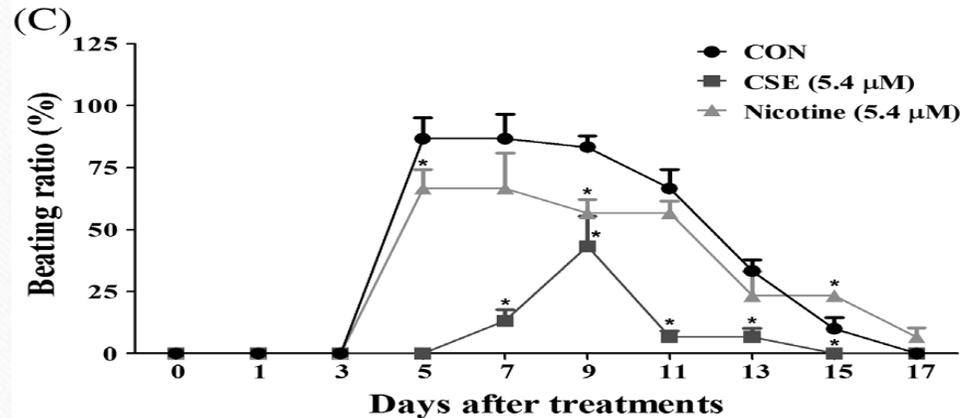
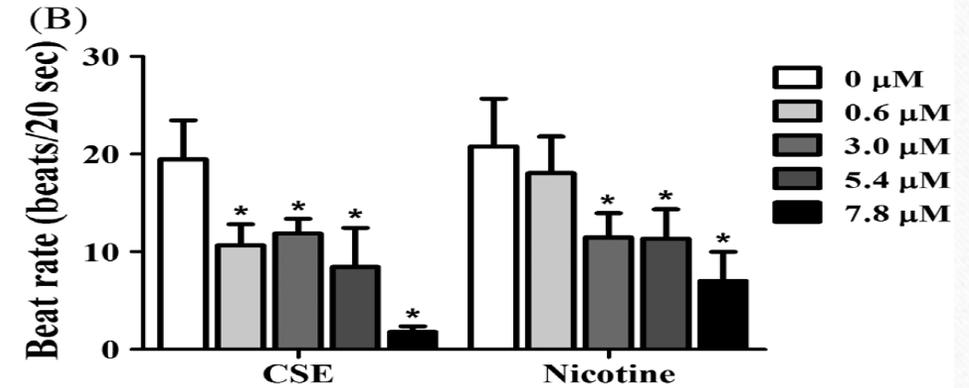
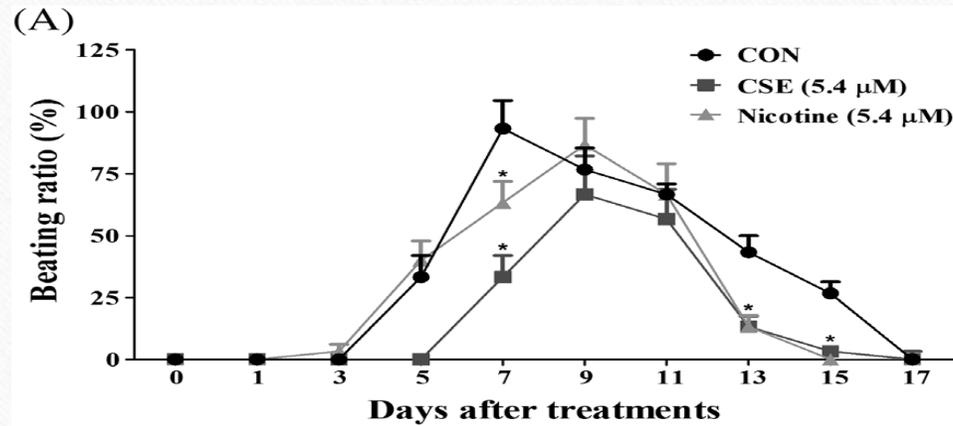
- AL CONTRARIO DELLA NICOTINA, CSE RIDUCE LA TAGLIA DEI CORPI EMBRIONALI:



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

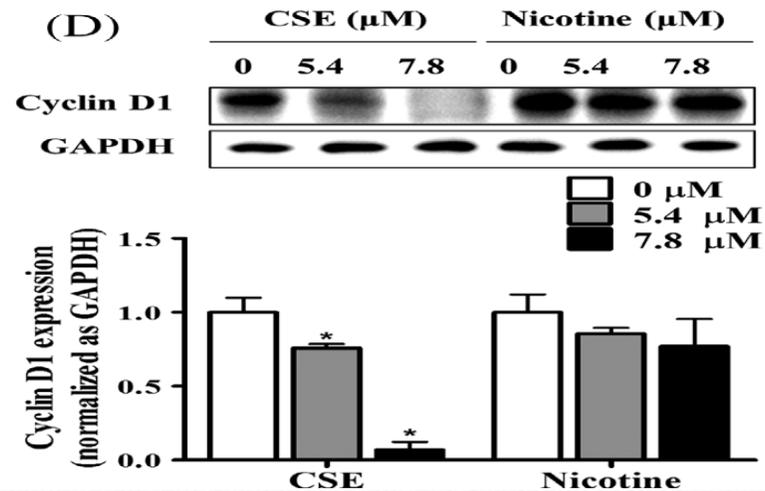
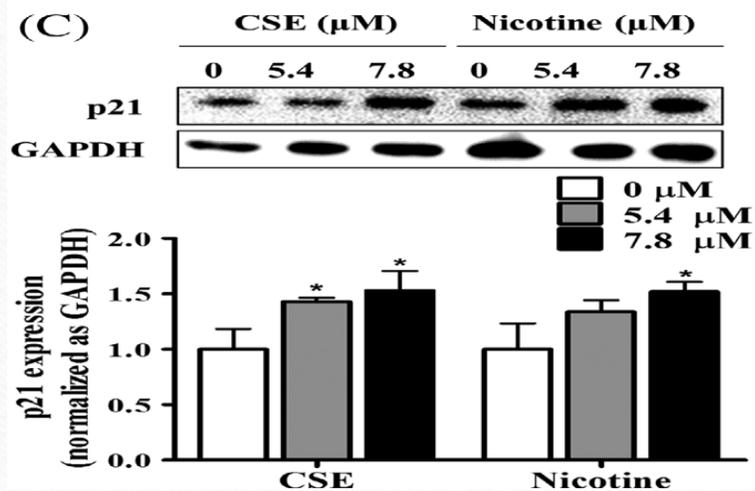
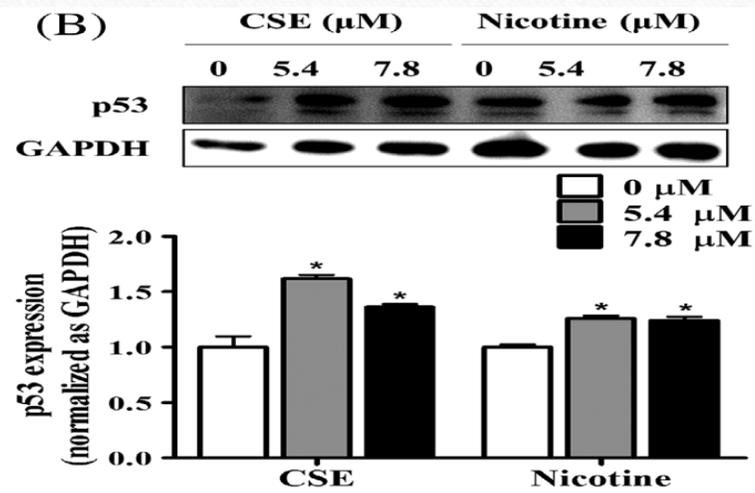
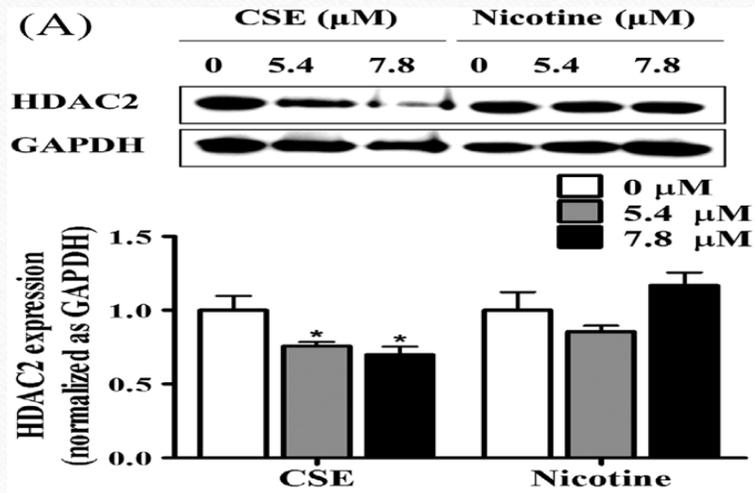


• ...RITARDANO LA DIFFERENZIAZIONE NEI CARDIOMIOCITI...



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

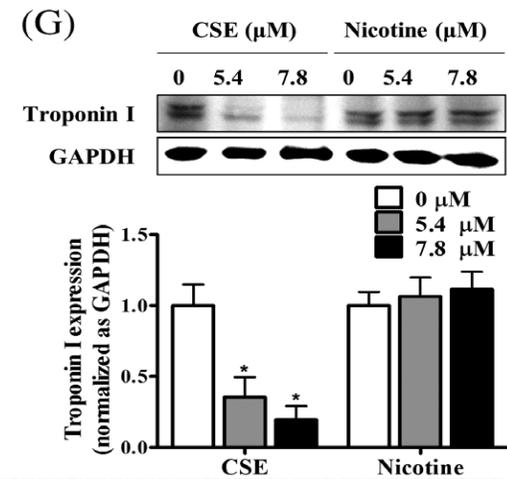
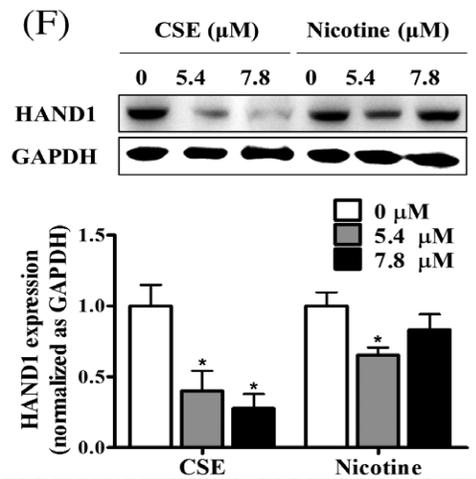
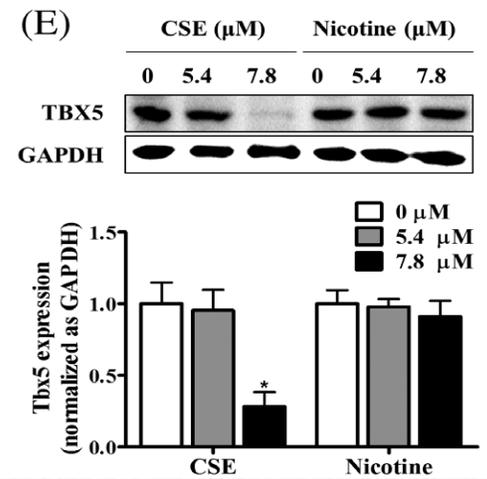
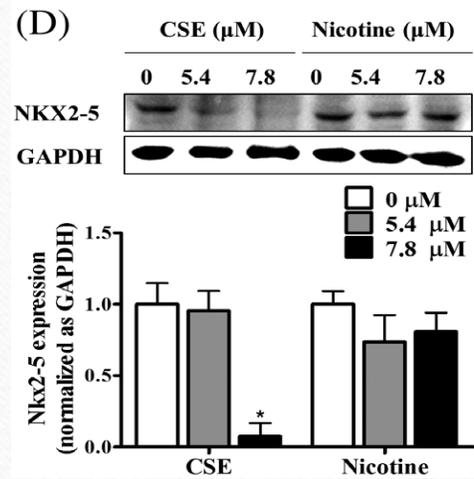
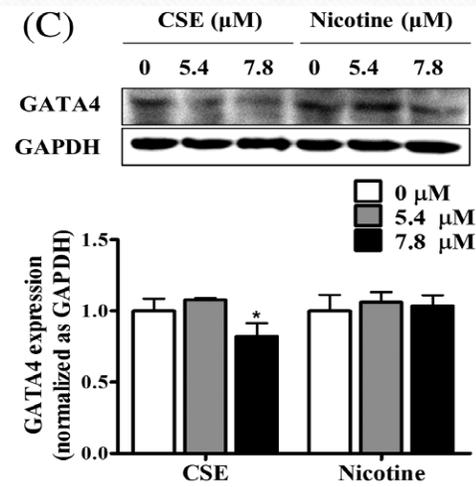
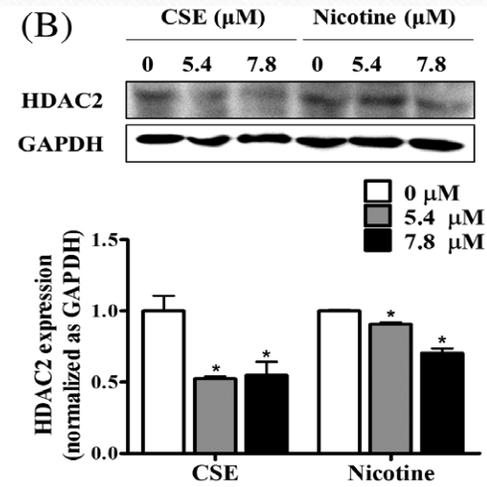
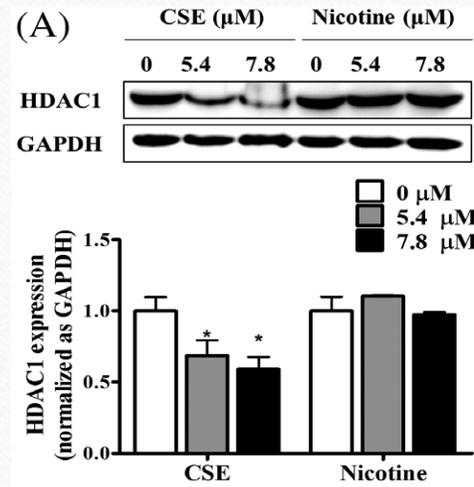
• CSE E NICOTINA INFLUENZANO L'ESPRESSIONE PROTEICA DEI GENI CORRELATI ALLA CRESCITA DEI CORPI EMBRIONALI



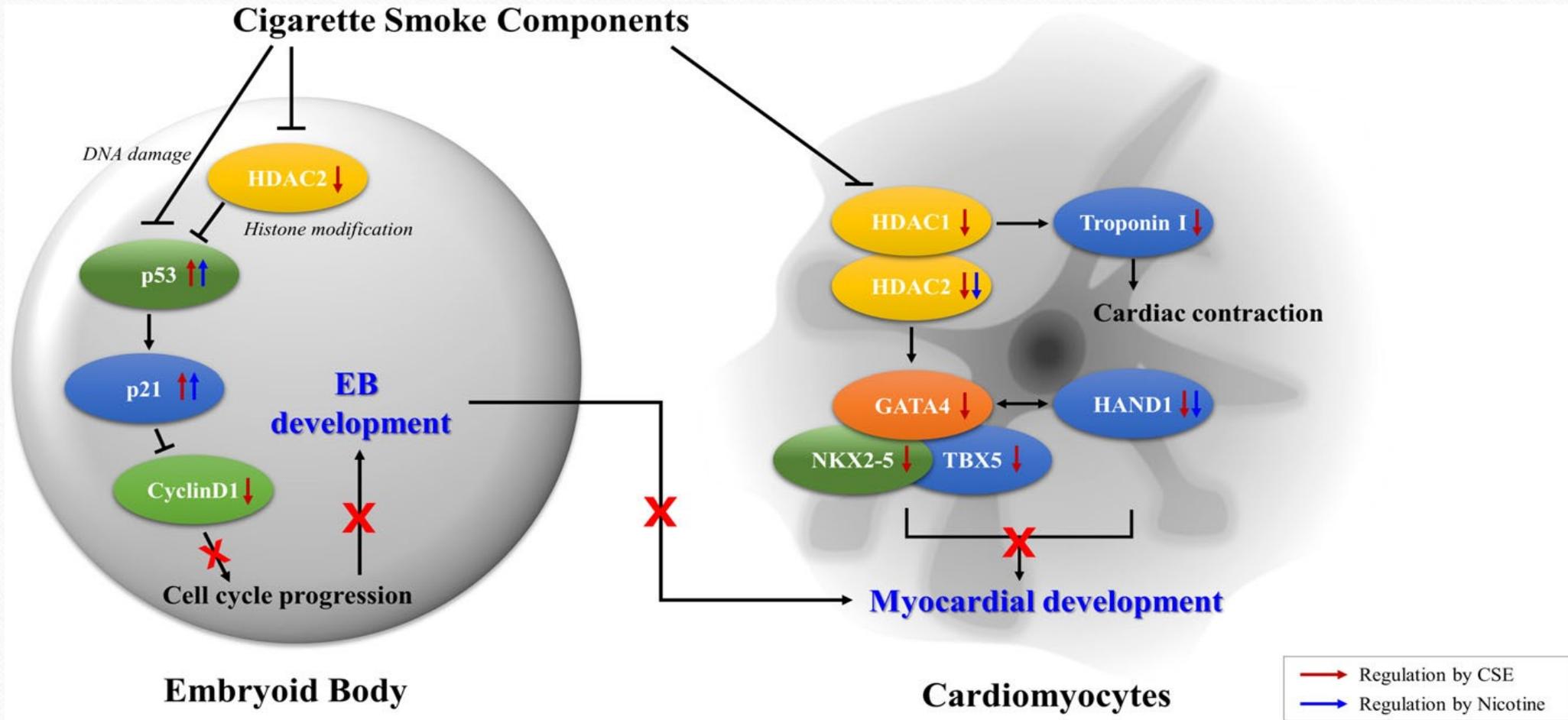
*CSE ha ridotto l'espressione proteica di HDAC2 e ciclina D1 ma ha aumentato quella di p53 e p21

*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!!!!