



Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE E TECNOLOGIE

BIOMOLECOLARI E MORFOLOGICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA E

MORFOGENESI UMANA

XXI Ciclo

Settore Disciplinare BIO/16

**“NUOVE PROSPETTIVE TERAPEUTICHE  
NELLA RIGENERAZIONE MIOCARDICA  
POST-INFARTO: RUOLO DEL TRAPIANTO  
CELLULARE DI MIOBLASTI SCHELETRICI”**

Dr.ssa Martina Margheri

Coordinatore

Prof. Paolo Pacini

Tutor

Prof.ssa Lucia Formigli

# INDICE

<i>INDICE</i>	2
<i>PREMESSA E SCOPO DELLO STUDIO</i>	5
<i>INTRODUZIONE FASE I</i>	6
Cellule per cardiomioplastica di derivazione allogenica	8
Cellule per cardiomioplastica di derivazione autologa	10
Studi sperimentali su modelli animali di CCM	13
Ruolo della Relassina come ormone cardiotropico	17
Vie di somministrazione cellulare in CCM	18
<i>MATERIALI E METODI FASE I</i>	19
Colture cellulari	19
Trattamenti chirurgici.	19
Immunofluorescenza confocale	20
Colture cellulari	21
Determinazione della fibrosi	22
Determinazione della fibrosi	22
Attività della metalloproteasi di matrice nel tessuto cardiaco e nelle C2C12.	22
Determinazione della densità dei capillari.	23
Espressione di VEGF nel tessuto cardiaco.	23

<b>Analisi della funzionalità cardiaca.</b>	<b>24</b>
<b>Analisi statistica.</b>	<b>24</b>
<b><i>RISULTATI FASE I</i></b>	<b>26</b>
<b>Analisi morfologica della presenza di cellule mioblastiche nel miocardio post- infartuato</b>	<b>26</b>
<b>Rimodellamento della matrice extracellulare e densità dei capillari nel miocardio post-infartuato</b>	<b>30</b>
<b>Livelli plasmatici e tissutali di RLX</b>	<b>33</b>
<b>Funzionalità cardiaca dopo il trapianto cellulare</b>	<b>33</b>
<b><i>DISCUSSIONE FASE I</i></b>	<b>36</b>
<b><i>INTRODUZIONE FASE II</i></b>	<b>40</b>
<b><i>MATERIALI E METODI FASE II</i></b>	<b>42</b>
<b>Culture cellulari e co-culture.</b>	<b>42</b>
<b>Microscopia confocale.</b>	<b>42</b>
<b>MitoTracker.</b>	<b>43</b>
<b>Microscopia elettronica a trasmissione.</b>	<b>44</b>
<b>RT-PCR per il recettore della RLX RXFP1.</b>	<b>44</b>
<b>Ca<sup>2+</sup> imaging.</b>	<b>44</b>
<b>Elettrofisiologia.</b>	<b>45</b>
<b>Analisi statistica.</b>	<b>45</b>

<b><i>RISULTATI FASE II</i></b> .....	<b>46</b>
<b>Caratterizzazione morfo-funzionale di cellule cardiache in monocultura</b> .....	<b>46</b>
<b>Caratterizzazione morfo-funzionale di cellule cardiache in presenza di mioblasti</b>	
<b>C2C12 e RLX</b> .....	<b>52</b>
<b>Accoppiamento intercellulare</b> .....	<b>56</b>
<b><i>DISCUSSIONE FASE II</i></b> .....	<b>59</b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b> .....	<b>63</b>

## **PREMESSA E SCOPO DELLO STUDIO**

Nonostante i recenti progressi terapeutici, l'incidenza delle malattie cardiovascolari rimane tutt'oggi sensibilmente elevata e con un notevole impatto sociale. La scarsità di donatori per il trapianto cardiaco e la limitata capacità del miocardio a rigenerare dopo un danno, hanno stimolato nell'ultimo decennio una costante ricerca volta alla identificazione di nuove strategie terapeutiche capaci di favorire la rigenerazione del tessuto danneggiato dall'ischemia miocardica. La cardiomioplastica cellulare (CCM), ovvero il trapianto di cellule staminali di varia provenienza con lo scopo di colonizzare le aree necrotiche di tessuto miocardico, sta emergendo come una nuova potenzialità terapeutica per il trattamento delle disfunzioni ventricolari conseguenti all'infarto miocardico. Sulla base di tutte queste considerazioni, il presente studio è stato effettuato per ampliare la nostra conoscenza sui potenziali meccanismi alla base dei benefici funzionali del trapianto di cellule staminali nel cuore post-infartuato. A tale scopo in una prima fase della sperimentazione (fase I), cellule mioblastiche C2C12, geneticamente modificate per esprimere la green fluorescent protein (eGFP) o eGFP e RLX, sono state inoculate attraverso la via retrograda coronarica venosa in suini sottoposti ad infarto sperimentale cronico del miocardio mediante legatura dell'arteria coronarica discendente anteriore di sinistra. Dopo 1 mese dall'infarto sono state prelevate biopsie dall'area post-infartuata per l'analisi istologica, atta a valutare la colonizzazione delle cellule nel miocardio danneggiato ed i loro effetti paracrini (i.e. induzione neoangiogenesi e rimodellamento del collagene). Gli effetti funzionali sulla performance cardiaca sono stati valutati mediante l'analisi ecocardiografica.

In una seconda fase (fase II), ci siamo focalizzati sugli effetti in vitro esercitati dai mioblasti e dalla RLX sulla regolazione del processo proliferativo e di differenziamento di cardiomioblasti isolati da cuori di topi neonati. A tale scopo sono state allestite co-culture di cardiomiociti neonatali e mioblasti scheletrici, sia wild type che geneticamente modificati per l'espressione di RLX, caratterizzandoli da un punto di

vista immunofenotipico ed elettrofisiologico.

## **INTRODUZIONE FASE I**

Le cardiopatie ischemiche sono la principale causa di morte nei paesi industrializzati.<sup>1</sup> La necrosi tissutale che segue il fenomeno ischemico determina una diminuzione del numero e della funzionalità delle cellule muscolari cardiache nella zona colpita. La perdita cellulare si manifesta con una disfunzione contrattile conseguente alla progressiva sostituzione delle cellule cardiache con tessuto cicatriziale. Il rimodellamento ventricolare che segue all'infarto miocardico acuto può portare quindi ad un danno cardiaco irreversibile. In particolare, il processo di rimodellamento ventricolare è caratterizzato dalla rimozione del tessuto necrotico accompagnata alla formazione di tessuto di granulazione e all'induzione di neo-angiogenesi nell'area perinfartuale. Quest'ultimo fenomeno è un prerequisito fondamentale per la sopravvivenza dei cardiomiociti circostanti che, rimanendo vitali vanno incontro ad ipertrofia. Il processo di rimodellamento termina con la formazione di una cicatrice fibrosa, attraverso l'espressione di isoforme embrionali delle proteine contrattili, circondata da un tessuto miocardico ipertrofico con deficit funzionali che può condurre all'insufficienza cardiaca. Il trattamento di elezione nelle fasi finali dello scompenso cardiaco è il trapianto d'organo, ma poiché risulta limitato dalla disponibilità dei donatori e dalle complicazioni legate alle problematiche immunologiche, particolare attenzione è stata recentemente rivolta allo sviluppo del trapianto cellulare come alternativa al trapianto d'organo. Tra le differenti terapie disponibili per la cura delle forme più avanzate di scompenso cardiaco, il trapianto cardiaco e l'assistenza ventricolare meccanica sono quelle che più riescono a modificare la storia della malattia<sup>2,3</sup>. Tuttavia tali terapie presentano tutt'oggi alcuni limiti legati alla penuria dei donatori<sup>5</sup> e all'insorgenza di complicanze nelle assistenze ventricolari<sup>3</sup>. I più recenti progressi sulla biologia molecolare e cellulare hanno aperto una nuova potenziale finestra terapeutica per il trattamento dell'insufficienza cardiaca: il trapianto cellulare o cardiomoplastica cellulare (CCM)<sup>6</sup>. Quest'ultima consiste nell'inoculo di cellule

staminali di varia provenienza nel contesto del tessuto miocardico danneggiato allo scopo di favorire la formazione di nuovo tessuto contrattile ripristinando la funzionalità cardiaca . Da un punto di vista funzionale, i requisiti fondamentali che le cellule innestate devono possedere sono:

- colonizzare il miocardio (integrazione anatomica). Tale requisito è ovviamente condizione fondante qualsivoglia innesto cellulare terapeutico. Ciò implica che le cellule innestate sono in grado di sopravvivere nel tessuto ricevente, sia esso una cicatrice o tessuto muscolare patologico. È stato ipotizzato che in determinate situazioni di insufficiente apporto ematico, parte delle cellule innestate devono anche essere in grado di contribuire alla propria vascolarizzazione, con la creazione di nuovi vasi (angiogenesi);
- differenziare in senso cardiomiocitario. Le cellule innestate devono possedere una “plasticità” cellulare che permette una loro “riprogrammazione” all’interno del tessuto ricevente;
- contrarsi efficacemente (integrazione funzionale). La candidatura dei vari tipi cellulari, come vedremo successivamente, ricade su cellule che abbiano proprietà contrattili, o che possano acquisirle una volta innestate nel miocardio ricevente;
- creare un accoppiamento elettromeccanico con il tessuto miocardico circostante (integrazione elettromeccanica). Tale requisito è senz’altro difficile da dimostrare. In linea teorica, un cardiomiocita di nuova formazione non soltanto deve contrarsi efficacemente ma deve anche poterlo fare in sinergia con il miocardio ospite circostante. Ciò implica che le nuove cellule formino giunzioni intercellulari comunicanti con i cardiomiociti nativi al fine di ricevere lo stimolo elettrico, e che siano in grado di rispondere ad esso. La capacità di accoppiarsi elettromeccanicamente a cellule circostanti può avvenire spontaneamente mediante l’attuazione di un programma differenziativo nella cellula ospite o può essere indotto artificialmente attraverso l’introduzione di geni che favoriscano la formazione di giunzioni comunicanti con i miociti preesistenti.

Le evidenze prodotte in modelli sperimentali suggeriscono che vi sono differenti

possibili sorgenti di reperimento di cellule che abbiano le potenzialità di soddisfare in ambito clinico le necessità sopra elencate<sup>7</sup>, tra cui le cellule staminali. Le cellule staminali sono cellule che mantengono immutata la loro capacità proliferativa durante tutta la vita dell'individuo, dividendosi asimmetricamente in due cellule figlie delle quali una mantiene le caratteristiche di staminalità e l'altra, invece, inizia il processo di differenziamento. Nei mammiferi cellule staminali pluripotenti sono presenti nel nodo embrionale della blastocisti, nell'embrione e nel feto<sup>6</sup> si trovano in misura minore anche nell'individuo adulto, ma solo in particolari distretti dell'organismo. Le sorgenti di reperimento cellulare potenzialmente utilizzabili in ambito clinico per la CCM possono essere classificate in due categorie principali: allogenica e autologa. La derivazione allogenica prevederebbe l'utilizzo di cellule ricavate da embrioni umani, da feti (donatori cadaveri) o da cordone ombelicale, mentre la derivazione autologa invece utilizzerebbe cellule prelevate dallo stesso paziente destinato a ricevere la CCM.

### ***Cellule per cardiomioplastica di derivazione allogenica***

Per allogenica si intende una fonte di reperimento geneticamente non identica al ricevente. Allo stato attuale, i tipi cellulari allogenici più sperimentati per prospettive di trapianto nell'uomo sono le cellule staminali embrionali (ES) umane, i cardiomiociti fetali (CF) o neonatali, e le cellule staminali ematopoietiche (CSE) da cordone ombelicale.

*Cellule staminali embrionali.* Vi sono sempre maggiori evidenze sperimentali che le ES derivate da blastocisti umana (hES) possano essere selezionate e coltivate in vitro. Queste cellule hanno la proprietà di essere "totipotenti", cioè in grado di differenziare in vitro ed in vivo in molti tipi cellulari differenti. Recentemente, si è dimostrato che varie linee di ES umane sono in grado di dare origine in coltura a cellule nervose, cellule ematopoietiche e cellule endoteliali.<sup>8</sup> La prima dimostrazione del potenziale cardiomiogenico delle hES è stata data da Itskovitz-Eldor et al.<sup>9</sup> che hanno selezionato tra i differenti tipi cellulari ottenuti dal differenziamento in vitro delle hES delle cellule simili a cardiomiociti, con capacità contrattili. Seguendo questa linea di ricerca, Kehat

et al.<sup>10</sup> hanno dimostrato la presenza di cardiomiociti in fase precoce di differenziazione ottenuti da colture di cellule staminali di derivazione embrionale. Tali cellule hanno dimostrato avere le proprietà ultrastrutturali, genetiche e funzionali dei cardiomiociti differenziati. Il potenziale vantaggio dell'utilizzazione delle hES rispetto alle cellule staminali adulte è la illimitata capacità di proliferare in vitro e di generare un'ampissima gamma di linee cellulari. Gli ostacoli principali all'uso delle ES per il trapianto nel miocardio sono però la difficoltà di ottenere una popolazione pura e riproducibile di cardiomiociti ventricolari e le reazioni di rigetto. La possibilità di utilizzare ES umane per lo sviluppo di trapianti a carattere terapeutico ha generato inoltre una serie di dibattiti riguardanti gli aspetti etici dell'impiego di embrioni umani come materiale di partenza da cui ottenere cellule staminali. Vi sono inoltre potenziali significative limitazioni per un impiego terapeutico. Infatti, le hES più indifferenziate possono dare formazione a tumori benigni (teratomi)<sup>11</sup> e maligni (teratocarcinomi). In secondo luogo, l'aspetto immunologico non è stato ancora approfondito e non è chiaro se cellule derivate dalle hES in vitro possano dar luogo ad una reazione immunitaria da parte dell'organismo ricevente. Quindi, l'utilizzo clinico delle hES appare oggi ancora ipotetico.

*Cardiomiociti fetali.* Studi sperimentali hanno dimostrato la fattibilità del trapianto di CF in una cicatrice miocardica. I CF appaiono dopo l'innesto come veri e propri cardiomiociti, con sarcomeri e giunzioni intercellulari composte da desmosomi e fascia "adherens"<sup>14</sup>. Inoltre, 2 settimane dopo l'impianto, tali cellule partecipano al supporto ematico del tessuto ricevente. Li et al.<sup>15,16</sup> hanno dimostrato, in un preparato isolato da cuore di roditore che, dal punto di vista funzionale, il tessuto neo-miocardico formato da cardiomiociti fetali ha la capacità di contenere l'espansione cicatriziale post-infartuale e migliorare la contrattilità ventricolare. Un'analoga osservazione sperimentale è stata condotta da Scorsin et al.<sup>17</sup> con il trapianto di cardiomiociti fetali in animali adulti portatori di ischemia miocardica acuta. I parametri emodinamici (frazione di eiezione, indice cardiaco) erano migliori nei roditori sottoposti a CCM con cardiomiociti fetali rispetto ai controlli. Inoltre, l'area infartuale si dimostrava significativamente ridotta. Tuttavia, sebbene l'impiego di cardiomiociti fetali a

scopo terapeutico appaia dal punto di vista sperimentale molto promettente, rimangono irrisolte le problematiche sovraesposte a proposito delle ES: il potenziale immunologico, tumorigeno e infettivo. Infine, non da sottovalutare nel caso di questo modello è la difficoltà di un reperimento quantitativamente significativo per un largo uso clinico di queste cellule.

*Cellule staminali da cordone ombelicale umano.* Diversi studi in topi e ratti immunosoppressi hanno mostrato che cellule staminali CD34+ ottenute dal sangue del cordone ombelicale umano hanno la potenzialità di colonizzare tessuti ischemici e dare origine a cellule endoteliali e vasi neoformati<sup>19,20</sup>. Ciò suggerisce che queste cellule posseggono una capacità differenziativa superiore rispetto a quanto descritto precedentemente e che esse rappresentano probabilmente cellule in grado di colonizzare con successo il miocardio e differenziare in cardiomiociti.

Le problematiche sovraesposte sono potenzialmente risolvibili solamente con l'uso di cellule geneticamente identiche al ricevente. Gran parte della ricerca si sta orientando verso lo studio delle cellule staminali autologhe.

### ***Cellule per cardiomioplastica di derivazione autologa***

Per autologa si intende una fonte di reperimento geneticamente identica al ricevente. Le tre categorie di cellule più utilizzate sono: cellule staminali isolate dall'individuo adulto, cellule muscolari e cardiomiociti.

*Cellule staminali isolate dall'individuo adulto.* Le cellule staminali sono cellule indifferenziate con la caratteristica di rinnovarsi e di dare origine ad una progenie di cellule differenziate. Studi recenti hanno dimostrato la presenza di tali cellule in diversi tessuti adulti, come il sistema nervoso, il muscolo scheletrico, il midollo osseo, il fegato e l'epidermide. Fino a poco tempo fa si riteneva che tali cellule fossero in grado di rigenerare solo il tessuto nel quale risiedevano ma, negli ultimi anni, numerose evidenze sperimentali hanno smentito tale dogma dimostrando come cellule isolate da un determinato tessuto sono in grado di trans-differenziare in cellule di un tessuto di origine diversa<sup>35</sup>. Attualmente le cellule staminali del midollo osseo (CMO)

costituiscono una fonte di reperimento molto promettente per CMC autologa in ambito clinico. Il crescente interesse cardiologico nei confronti delle CMO deriva dal fatto che recenti evidenze sperimentali effettuate in vitro, hanno dimostrato che esse possono essere indotte a differenziarsi sia in cardiomiociti che in cellule endoteliali di nuovi vasi<sup>36</sup>. Nel midollo si trovano principalmente due differenti popolazioni cellulari: a) le CSE e b) le cellule staminali mesenchimali (CSM). Da studi molto recenti, esisterebbero poi cellule staminali addirittura residenti nel miocardio stesso (cellule staminali cardiache).

*Cellule staminali ematopoietiche.* Le CSE presentano un'elevata plasticità nel generare non soltanto le cellule del sangue, bensì diversi tipi di cellule mature, quali cellule muscolari lisce, cardiomiociti<sup>30</sup> e CMS37. Questa loro plasticità è determinata dalla presenza, nell'ambito della popolazione di CSE, di precursori cellulari che possono essere identificati dall'espressione di specifici marker di superficie come le molecole cKit, CD34 e Sca-1. La possibilità di identificare cellule staminali in base all'espressione di marker di superficie ha permesso di individuare, nel midollo osseo, sottopopolazioni cellulari con diverso potenziale differenziativo. In particolare, è stato dimostrato come cellule cKit+ e Sca-1+, note anche con il nome di "side population", che costituiscono lo 0.05% delle cellule totali presenti nel midollo osseo, abbiano un'elevata capacità di ripopolare il midollo osseo in animali irradiati e di contribuire alla rigenerazione del tessuto cardiaco ischemico<sup>29</sup>. L'espressione del marcatore CD34 identifica, invece, le cellule progenitrici di endotelio<sup>38</sup>, le quali, in seguito ad ischemia del tessuto scheletrico<sup>39</sup> o del tessuto cardiaco<sup>40</sup>, e/o a trattamenti con citochine quali il "granulocyte macrophage colony stimulating factor"<sup>41</sup> e fattori angiogenetici (fattore di crescita vascolare endoteliale)<sup>42</sup> sono mobilitate dal midollo osseo nel circolo periferico e reclutate a formare nuovi vasi nei tessuti danneggiati. Tali evidenze sperimentali, insieme alla dimostrazione che cellule staminali sono normalmente presenti nel circolo periferico e sono in grado di differenziare in diversi tipi cellulari,<sup>43</sup> offrono la possibilità di sviluppare un nuovo approccio terapeutico non invasivo, per la rigenerazione del tessuto cardiaco.

*Cellule staminali mesenchimali.* Le CSM sono cellule staminali derivate dalla frazione stromale, non ematopoietica, del midollo osseo. Se trapiantate in sede ectopica possono dare origine a tessuti che derivano dal mesoderma embrionale, come tessuto adiposo, tessuto connettivo e il tessuto reticolare di supporto dei vasi sanguigni. In realtà la plasticità di tali cellule è ben più ampia in quanto, studi recenti dimostrano che le CSM sono in grado di generare cellule derivanti da un foglietto embrionale diverso dal mesoderma, come le cellule neuronali<sup>44</sup> e cardiache<sup>45</sup>. Sulla base di tali evidenze sperimentali e considerata la relativa facilità di isolamento e di espansione in coltura delle CSM, è naturale ritenere che queste cellule sono tra i migliori candidati da poter utilizzare per fini terapeutici volti alla ricostruzione di diversi tessuti.

*Cellule staminali cardiache.* Per lungo tempo si è ritenuto che le cellule cardiache adulte, fossero terminalmente differenziate, incapaci di rinnovarsi e pertanto di rigenerare il miocardio. Tale dogma è stato recentemente smentito da una recente pubblicazione<sup>46</sup> in cui gli autori mostrano la presenza di cardiomiociti proliferanti nel miocardio infartuato. Ma qual è l'origine di tali cellule? Una risposta a questa domanda è stata fornita da Quaini et al.<sup>47</sup> i quali hanno individuato cellule staminali, cKit+, Sca-1+ e MDR1+, nell'atrio e nell'apice del ventricolo del miocardio. L'identificazione di tali cellule è il risultato di una serie di esperimenti volti a caratterizzare il fenomeno del chimerismo nei trapianti cardiaci. Analizzando cuori umani trapiantati in individui di sesso maschile e provenienti da individui di sesso femminile mediante una tecnica che permette di evidenziare il cromosoma Y, la presenza di cellule del ricevente sono state identificate all'interno del cuore trapiantato dimostrando, dunque, il fenomeno del chimerismo. Tuttavia la maggior parte delle cellule cKit+ e MDR1+ non erano Y+, suggerendo l'ipotesi che cellule staminali cardiache risiedano nel miocardio.

*Cellule muscolari.* Una seconda interessante fonte per CMC nell'uomo è rappresentata dalle cellule muscolari lisce e dalle cellule satelliti (mioblasti scheletrici). La facilità di reperimento e la possibilità di espansione in vitro ha fatto di queste cellule la prima fonte di utilizzazione per CCM dapprima in animale da esperimento e, più recentemente, anche in ambito clinico. I mioblasti scheletrici si trovano in prossimità della lamina basale che avvolge le singole miofibre, e sono coinvolte nei

meccanismi di rigenerazione muscolare dopo traumi o lesioni del muscolo scheletrico. Queste cellule una volta nel miocardio hanno dimostrato di possedere alcune caratteristiche istologiche simili ai cardiomiociti<sup>50</sup> e di contrarsi efficacemente<sup>51</sup>. Un ulteriore vantaggio offerto dalle cellule muscolari scheletriche è la capacità di acquisire resistenza alla fatica, modificando le caratteristiche delle proteine contrattili<sup>52</sup>. D'altro canto, l'impossibilità dei miociti di origine scheletrica a stabilire giunzioni di tipo comunicante ("gap junctions"), fa supporre che queste cellule non possano accoppiarsi elettromeccanicamente con i cardiomiociti e che quindi la loro funzione si espliciti essenzialmente a livello meccanico (ispessimento della cicatrice infartuale) più che meccanico-funzionale (contributo alla contrazione).

*Cardiomiociti.* La terza promettente linea cellulare per l' utilizzo clinico in cardiomioplastica autologa, anche se per adesso solo in prospettiva futura, è rappresentata dalle stesse cellule muscolari cardiache mature. In linea teorica, il prelievo autologo di cardiomiociti nel cuore umano è possibile sia durante intervento cardiocirurgico, sia con prelievo biotipico, rendendo i cardiomiociti una sorgente cellulare utilizzabile in ambito clinico.

### ***Studi sperimentali su modelli animali di CCM***

Le cellule più utilizzate per la CCM in modelli sperimentali pre-clinici e clinici sono le cellule staminali del midollo osseo e i mioblasti scheletrici.

*Studi sperimentali su cellule staminali del midollo osseo.* I modelli sperimentali hanno permesso di definire il ruolo delle cellule staminali del midollo osseo nella CCM autologa. Ad esempio, Jackson et al.<sup>29</sup> hanno trapiantato cellule staminali ematopoietiche in topi irradiati che sono stati successivamente sottoposti a legatura dell'arteria coronaria interventricolare anteriore (IVA). La successiva analisi del tessuto infartuale ha rivelato la presenza delle cellule staminali ematopoietiche del ricevente, suggerendo che queste cellule erano state mobilizzate dal midollo ed indotte a colonizzare il miocardio da non precisati fattori di mobilizzazione e reclutamento all'interno della lesione infartuale. Risultati ancora più promettenti si sono ottenuti con

inoculazione diretta intramiocardica. Orlic et al.<sup>30</sup> hanno utilizzato cellule staminali ematopoietiche per CCM autologa diretta nel topo. Il modello utilizzato è quello infartuale attraverso la legatura dell'IVA. Cellule staminali purificate per mezzo di un marker cellulare di superficie (Lin-cKit+), sono state iniettate nel miocardio peri-infartuale. Nove giorni dopo l'impianto, si è osservata la formazione di neocardiomiociti, di endotelio vascolare e di cellule muscolari lisce. Il risultato è quindi la creazione di nuovo tessuto miocardico comprensivo di letto vascolare (arteriole e capillari). Tale rigenerazione interessa fino al 68% della preesistente area infartuale. Dalle suddette evidenze sperimentali appare quindi come le cellule staminali del midollo osseo abbiano un grande potenziale terapeutico per la rigenerazione del tessuto miocardico danneggiato, essendo in grado di differenziarsi sia in cardiomiociti che in neovasi, potendo quindi essere impiegate sia con finalità riparative, che di rivascularizzazione. Hamano et al.<sup>33</sup> hanno recentemente utilizzato un modello di ischemia/infarto cronico nel cane, con impianto autologo di cellule prelevate dal midollo osseo. Tale studio preclinico ha dimostrato che l'impianto di cellule staminali del midollo osseo prelevate dalla cresta iliaca e purificate, è in grado, rispetto ai controlli, di ispessire la regione miocardica cronicamente ischemica, e l'esame istologico ha evidenziato un aumento del numero dei capillari. Dal punto di vista funzionale, l'analisi ecocardiografica non ha permesso invece di evidenziare un incremento significativo della contrattilità ventricolare. Gli autori hanno concluso che le cellule del midollo osseo impiantate con questa tecnica hanno proprietà cardiomiogeniche ed angiogeniche, pur non essendo probabilmente così numerose da incidere sulla funzione contrattile dell'area ischemico-infartuale. Un secondo studio preclinico molto interessante è stato recentemente condotto da Tomita et al.<sup>34</sup>, utilizzando un modello infartuale nel maiale. Le cellule staminali mesenchimali sono state aspirate dallo sterno, coltivate ed incubate con 5-azacitidina. Una volta iniettate nella regione infartuale, queste cellule hanno dato luogo, dopo 4 settimane dall'impianto, ad isole di neocardiomiociti (con sarcomeri, bande Z e positività per troponina I), supportate da una rete vascolare, in grado di ispessire significativamente la regione cicatriziale. Dal punto di vista dell'emodinamica cardiaca, si è inoltre

notato che i cuori sottoposti a CCM sviluppavano un lavoro cardiaco maggiore rispetto ai controlli, con volumi sistole-diastolici indicativi di un minore rimodellamento post-infartuale. Questo studio dimostra quindi che la CCM con cellule del midollo osseo è potenzialmente efficace nel migliorare la funzione ventricolare nella cardiopatia dilatativa ad eziologia ischemica.

*Studi sperimentali con mioblasti scheletrici.* Un importante modello sperimentale di CCM con cellule muscolari scheletriche è stato messo a punto da Taylor et al.<sup>27</sup>. Essi hanno trapiantato da fonte autologa mioblasti scheletrici nel miocardio di coniglio 1 settimana dopo criolesione transmurale. I risultati sono stati parzialmente incoraggianti per quanto riguarda attecchimento e funzionalità: in 7 conigli su 12 si è osservato l'attecchimento dei mioblasti. L'analisi istologica ha dimostrato isole di strutture miotubulari nel contesto della regione cicatriziale, con positività alla miogenina, caratteristica delle cellule trapiantate. In un gruppo più ristretto (5 animali) la funzione ventricolare sistolica e diastolica risultava significativamente migliore rispetto ai controlli. Tuttavia, un reperto controverso di questa serie di esperimenti, è stata la relativa scarsa quantità di CMS isolate nel contesto del miocardio sottoposto a trapianto, rispetto alla presenza di cellule con caratteristiche di cardiomiociti. Gli autori hanno sostenuto l'ipotesi della differenziazione non terminale delle CMS, che in un "milieu" miocardico sarebbero capaci di trasformarsi in cellule cardiache. A confermare questa tesi, lo stesso gruppo<sup>24</sup>, con un modello di infarto nel coniglio, suggerisce la possibilità da parte delle cellule muscolari impiantate (reperiti alla periferia dell'impianto cellulare) di differenziare in cardiomiociti immaturi.

Tuttavia, sembra improbabile una tale ipotesi. Vi sono infatti fondamentali differenze di struttura tra i miociti scheletrici e quelli cardiaci, che rendono problematica l'integrazione funzionale delle cellule muscolari scheletriche nel miocardio. La prima differenza è la mancanza di giunzioni intercellulari di tipo "gap junctions" nelle CMS<sup>53,54</sup>; la seconda riguarda l'isoforma del recettore diidropiridinico, responsabile della trasformazione dell'impulso elettrico in contrazione meccanica. Inoltre i mioblasti scheletrici mostrano nessuna o poca tendenza ad assumere un fenotipo cardiaco al momento del trapianto, ma si differenziano in miotubi elettricamente e

funzionalmente isolati dal cuore ricevente. Queste differenze rendono evidentemente impossibile alle cellule muscolari un accoppiamento elettromeccanico nel contesto del tessuto miocardico. D'altra parte, un dato a favore delle cellule muscolari è la dimostrazione di un'alta resistenza nel contesto del tessuto miocardico<sup>21</sup>. In un modello canino di trapianto autologo, esse sono state trovate vitali a 3 mesi dall'impianto.

Studi sperimentali di CCM autologa sono stati condotti anche utilizzando cellule muscolari lisce. Queste possono facilmente essere prelevate e coltivate in vitro, avendo anche la capacità di produrre fattori angiogenetici come il fattore di crescita vascolare endoteliale e quindi di stimolare una rete vasale di supporto. Il gruppo di ricerca di Toronto<sup>26,56</sup>, ha impiantato cellule muscolari lisce in cavie con cardiomiopatia dilatativa, valutando a 4 settimane la funzione ventricolare sinistra in cuore isolato. Rispetto ai controlli, i cuori sottoposti a CCM dimostravano un incremento significativo del lavoro ventricolare ed una diminuzione dei volumi.

Le cellule muscolari scheletriche tuttavia hanno le stesse limitazioni funzionali delle cellule del midollo osseo per un'integrazione elettrica con i cardiomiociti circostanti.

*Studi clinici.* Precursori di cellule muscolari scheletriche (cellule satelliti) sono state le prime linee cellulari utilizzate per CCM nell'uomo, grazie alla facilità di prelievo e di coltura ed alle incoraggianti evidenze sperimentali. Pioniere di queste ricerche è il gruppo di Menasché a Parigi. Cellule autologhe (a larga percentuale mioblasti) prelevate dal muscolo vastus lateralis, ed opportunamente coltivate in vitro, sono state impiantate nel contesto di una cicatrice infartuale della parete ventricolare posteriore, con iniezione intramiocardica, in paziente portatore di insufficienza cardiaca congestizia (frazione di eiezione ecocardiografica bidimensionale 21%). La procedura è stata effettuata contestualmente all'esecuzione di by-pass coronarici. Cinque mesi dopo l'intervento, i controlli hanno dimostrato un incremento della frazione di eiezione globale (30%) e una ripresa della contrazione in parete posteriore (sede di CCM). Inoltre, uno studio con tomografia computerizzata ad emissione di positroni, ha dimostrato un moderato aumento di attività metabolica nel contesto della parete posteriore trapiantata. Questi dati clinici preliminari suggeriscono che nell'uomo la CCM con mioblasti scheletrici ha fornito incoraggianti risultati. Naturalmente, come sottolinea lo stesso Menasché,

rimangono interrogativi aperti a riguardo dell'effettiva capacità delle cellule muscolari a partecipare sinergicamente alla contrazione ventricolare e al destino delle cellule muscolari trapiantate nel lungo periodo.

Nonostante gli studi sperimentali e clinici abbiano dimostrato un effettivo recupero funzionale del miocardio post-infarto dopo CCM, l'entusiasmo per questa tecnica si è recentemente affievolito in considerazione della controversia concernente l'abilità delle cellule trapiantate (di qualsiasi provenienza) di dar luogo ad un tessuto contrattile integrato anatomicamente con il miocardio peri-infartuale. Tali osservazioni stanno orientando l'opinione degli studiosi verso l'idea che i benefici osservati dal CCM sulla funzionalità miocardica possano dipendere non tanto dall'azione diretta delle cellule trapiantate ma da effetti indiretti legati all'azione paracrina delle cellule stesse. Questa ipotesi ha ottenuto il sostegno di recenti risultati che dimostrano che il mezzo condizionato ottenuto da cellule staminali mesenchimali contiene fattori pro-angiogenetici i quali, iniettati in un cuore infartuato, contribuiscono al recupero funzionale del miocardio ischemico. Infatti la diminuzione delle fibre collagene e la concomitante riduzione della rigidità della cicatrice miocardica post-infarto, contribuisce al miglioramento della contrattilità e della compliance miocardica osservate dopo la CCM in modelli sperimentali murini. Comunque i mediatori di questi effetti benefici risultano ancora sconosciuti. Un potenziale approccio per testare l'ipotesi paracrina potrebbe essere quello di combinare la terapia cellulare con l'espressione in loco di fattori cardiotropici come ad esempio l'ormone relassina (RLX).

### ***Ruolo della Relassina come ormone cardiotropico***

La RLX meglio conosciuta per i suoi effetti nel sistema riproduttivo, è stata recentemente classificata come un ormone cardiotropico, dal momento che viene prodotta endogenamente nel cuore e agisce su specifici recettori presenti nel cuore stesso. Gli effetti cardiaci della relassina, principalmente l'incremento del flusso sanguigno e gli effetti cronotropi e inotropi positivi, insieme alla vasodilatazione sistemica, potrebbero giocare un ruolo fisiologico nel potenziare e correlare prestazioni

dell'apparato cardiocircolatorio alle necessità della gravidanza. Inoltre, gli effetti cardiovascolari della RLX si sono rilevati capaci di ostacolare e/o preservare i danni nel cuore post-infartuato. Infatti è stato dimostrato che la RLX è capace di: i) determinare un potente incremento del flusso coronarico favorendo in tal senso l'approvvigionamento di sangue al miocardio; ii) inibire l'aggregazione piastrinica e la migrazione dei neutrofili che giocano un ruolo importante nel danno da riperfusione miocardica; iii) diminuire l'adesività delle cellule endoteliali coronarie alle cellule infiammatorie riducendo l'espressione su queste cellule delle molecole di adesione leucocitaria. Inoltre, studi su roditori sottoposti ad ischemia cardiaca e riperfusione, hanno mostrato che RLX porcina, somministrata prima dell'induzione dell'ischemia, può ridurre il danno a livello del miocardio e aumentare la sopravvivenza degli animali infartuati. Questi studi sottolineano un possibile ruolo della RLX, esogena ed endogena, nella prevenzione dell'infarto miocardico. In tal senso risultano particolarmente rilevanti gli effetti dell'ormone sul rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) o sulla degradazione delle fibre collagene. Sta infatti emergendo l'abilità dell'RLX non solo di ridurre la sintesi delle proteine dell'ECM in molti organi non appartenenti alla sfera riproduttiva, come polmone, fegato, pelle e cuore, ma anche di incrementare la loro distruzione.

#### ***Vie di somministrazione cellulare in CCM***

Un altro problema cruciale della CCM riguarda anche la via di somministrazione delle cellule. Il metodo più comunemente utilizzato, perché più semplice da eseguire, è l'iniezione epicardica delle cellule direttamente nel contesto o ai margini dell'area ischemica. Tuttavia, questo metodo sembra favorire la generazione di gruppi di cellule che possono agire come focolai aritmogenici o produrre embolizzazione miocardica. Al contrario l'innesto delle cellule attraverso la via sistemica intracoronarica utilizzando degli appositi cateteri, sembra offrire, sebbene più complessa da praticare, alcuni vantaggi rispetto all'altro metodo, garantendo una diffusione più omogenea delle cellule nel miocardio post-infartuato.

## **MATERIALI E METODI FASE I**

### ***Culture cellulari***

Mioblasti scheletrici murini, linea cellulare C2C12 (ATCCC Manassas, VA) sono stati coltivati in DMEM contenente 10% di siero fetale (SIGMA Milano, Italia) e mantenuti a 37°C in atmosfera umidificata contenente 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state transfettate con il vettore lentivirale cDNA<sup>30</sup> codificante per la enhancer green fluorescent protein o per la proteina GFP fusa alla prepro-relassina 2 umana unita al promotore del citomegalovirus (CMV). Queste cellule sono state denominate rispettivamente C2C12/GFP e C2C12/RLX. I cloni sono stato selezionati con il metodo *ring cloning* ed analizzati attraverso il microscopio a fluorescenza e il citofluorimetro a flusso per valutare l'espressione di eGFP. La produzione di RLX da parte di C2C12/RLX è stata verificata analizzando il contenuto dell'ormone nel sovrinatante mediante ELISA.

### ***Trattamenti chirurgici.***

Lo studio è stato compiuto tenendo in considerazione il protocollo di Helsinki e le norme CEE sulla sperimentazione animale. Per indurre l'infarto miocardico, maiali maschi del peso di 30-40 kg sono stati sottoposti a legatura dell'arteria coronarica discendente anteriore di sinistra subito dopo l'emergenza del secondo ramo diagonale, in modo analogo al metodo precedentemente descritto<sup>26</sup>. Trenta giorni dopo l'intervento gli animali sono stati rioperati ed è stato inserito un ballon catetere nel seno coronarico per iniettare nell'area infartuata, attraverso la via retrograda venosa, i mioblasti C2C12/RLX o C2C12/GFP ( 80 x 10<sup>6</sup> cellule in 10-20 ml di terreno). Agli animali di controllo è stato iniettato il terreno senza cellule. Le cellule sono state iniettate per oltre 15 minuti ed il catetere ballon è stato lasciato per ulteriori 20 min per favorire la colonizzazione miocardica delle cellule. Al fine di aumentare le possibilità di innesto delle cellule eterologhe tutti gli animali trapiantati sono stati immunodepressi mediante somministrazioni giornaliere di ciclosporina (1mg/kg b.wt.) e di betametasona (0.1

mg/kg b.wt.). Lo stesso trattamento è stato somministrato agli animali di controllo non trapiantati; tutti gli animali sottoposti e non alla CCM sono stati poi sacrificati dopo un mese dal trattamento. Campioni biotici sono stati prelevati al di sotto (1 o 2 cm) dell'occlusione coronarica e sono stati utilizzati per l'analisi biochimica e morfologica. Complessivamente, la mortalità dopo l'induzione dell'infarto miocardico è stata più o meno del 30%. L'esperimento veniva concluso quando in ogni gruppo (animali controllo, animali riceventi C2C12/GRP e quelli riceventi C2C12/RLX) rimanevano 5 animali. I livelli di RLX prodotti dall'inoculo di cellule C2C12/RLX, sono stati misurati sia nel plasma isolato dal sangue periferico, sia su campioni di tessuto cardiaco presi dopo il sacrificio utilizzando un kit commerciale ELISA H2 RLX (Immunodiagnostik, Bensheim, Germania). Gli animali non trapiantati e quelli ai quali sono stati somministrati i mioblasti C2C12/GFP sono stati usati come controlli. Per rilevare la presenza di RLX nei campioni tissutali, frammenti di tessuto miocardico, ognuno di 50 mg di peso, sono stati tritati e omogeneizzati in un buffer di lisi freddo composto da 10 mmol/mg Tris/HCl pH 7.4, 10 mmol/mg NaCl, 1.5 mmol/mg MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/mg Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mmol/mg fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 1% Triton X-100, leupeptina (20 µg/ml), Pepstatina (1 µg/ml), Pefabloc (1 mg/ml), aprotinina (2.5 µg/ml). Dopo centrifugazione a 13,000 g per 10 min. a 4°C, il supernatante è stato raccolto e tenuto congelato a -20°C fino al momento del bisogno.

### ***Immunofluorescenza confocale***

Sezioni criostatate di spessore di 10 µm sono state ottenute da campioni di tessuto congelato, le fette sono state poi fissate in vapori di paraformaldeide per 10 min e successivamente incubate con i seguenti anticorpi primari: mouse anti-eGFP coniugato alla rodamina (1:200), mouse anti- $\alpha$ -actina sarcomerica (1:100), rabbit anti-VCAM-1 (1:100), mouse anti-ICAM-1(1:200). Dopo l'incubazione con gli anticorpi, i campioni sono stati lavati per rimuovere l'eccesso di anticorpi primari e poi incubati con anticorpi secondari anti-mouse o anti-rabbit coniugati con Alexa488 diluiti 1:200. I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo gli anticorpi primari con siero non immune. La

fluorescenza è stata rivelata con un microscopio confocale a scansione laser (Leica Microsystem, Mannheim, Germania) dotato di obiettivo Leika PlanApo X63 oil-immersion, di una sorgente laser e a HeNe/Argon per la fluorescenza e di un sistema ottico di contrasto interferenziale (DIC) per le immagini in trasmissione. Una serie di sezioni ottiche (1024X1024 pixels) ad intervalli di 0,8  $\mu\text{m}$  sono state ottenute e sovrapposte per creare una singola immagine composita.

Inoltre, la presenza di cellule mioblastiche GFP-positive è stata valutata in cinque aree microscopiche, ognuna di 32,400  $\mu\text{m}^2$  contenenti almeno un profilo vascolare. Le conte sono state effettuate da due diversi operatori .

### ***Colture cellulari***

Per l'analisi al microscopio elettronico a trasmissione, campioni di tessuto cardiaco sono stati fissati in glutaraldeide al 4% in tampone di sodio cocodilato 0.2M, pH 7.4 per 1h a T ambiente e postfissati in tetrossido di osmio 1% in tampone fosfato 0,1M, pH 7,4, per 1 h a 4 °C. I campioni sono stati poi disidratati in una serie crescente di acetone e in ossido di propilene ed infine inclusi in una resina epossidica Epon 812. Altri campioni non sono stati fissati in osmio ma utilizzati per la immunoelettromicroscopia al fine di rivelare l'espressione di RLX nelle cellule C2C12/RLX inoculate. In particolare, le sezioni ultrafini sono state trattate con perossido di idrogeno al 30% ed incubate con siero di capra (SIGMA, 1:20) per disattivare i siti aspecifici di legame ; successivamente, incubate con anticorpo primario policlonale anti-H2 RLX e infine con anticorpo secondario coniugato con particelle di oro colloidale di 5 nm di diametro (BBT International, Stansed, UK; 1:20). I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con siero non immune di coniglio. Infine, le sezioni ultrafini sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo ed esaminate al microscopio elettronico a trasmissione Jeol 1010 a 80.kV (Jeol, Tokio; Japan).

### ***Determinazione della fibrosi***

La fibrosi a livello della cicatrice cardiaca è stata analizzata in campioni inclusi in paraffina, fissati in paraformaldeide al 4%, attraverso metodi morfologici sia quantitativi che qualitativi. A tale scopo, sezioni di 8 µm di spessore sono state colorate con il metodo Van Gieson, specifico per il collagene (fucsina 0.1% in H<sub>2</sub>O contenente 0.08% HCl per 4 min., seguiti da 5 min. di sciacqui in etanolo 95%). Cinque campi microscopi per animale, ciascuno di area pari a 141,100 µm<sup>2</sup>, sono stati fotografati utilizzando una camera digitale applicata ad un microscopio ottico con obiettivo 20X. Nelle immagini digitali, la misurazione della superficie totale (SA) e della densità ottica (OD) delle fibre di collagene è stata eseguita usando il programma Scion Image Alpha 4.0.3.2. Per ogni animale è stato calcolato l'indice di sclerosi con la formula SA x OD x 10<sup>6</sup>. In ogni gruppo è stata calcolata la media dei valori ottenuti.

### ***Attività della metalloproteasi di matrice nel tessuto cardiaco e nelle C2C12.***

L'attività delle metalloproteasi/collagenasi di matrice è stata valutata attraverso zimografia. Colture primarie di cellule cardiache sono state ottenute incubando tessuto cicatriziale post-infartutato con soluzione salina di Hanks a pH 7.4, contenente collagenasi II (250 IU/ml), per 40 min a 37°C. Successivamente le cellule, (passaggio 0-1), sono state filtrate e piastrate in DMEM in una 12 well in modo da eliminare fibroblasti e cellule endoteliali. Le cellule cardiache ottenute sono state co-coltivate con mioblasti C2C12/RLX o C2C12/GFP per 72 h in DMEM senza siero, in rapporto di circa 3:1. Come controllo, sono state analizzate dopo 72 h di coltura, cellule cardiache primarie trattate e non con 1.8 ng/ml di RLX H2 ricombinante (Connetics Co., Palo Alto, California, USA) e cellule C2C12/RLX e C2C12/GFP subconfluenti. Il mezzo condizionato è stato quindi raccolto e centrifugato a 10,000 x g per 15 min. In alcuni esperimenti l'analisi zimografica è stata eseguita su lisati ottenuti da miocardio di animali post-infartuati di controllo e animali trapiantati. Il tessuto è stato omogeneizzato in un tampone freddo contenente 5mM Tris-HCl, 320 mM di saccarosio, 1mM DDT, 10 µg/ml di leupeptina, 10 µg/ml di inibitori della glicina, 2 µg/ml di aprotinina. Il tessuto

omogeneizzato è stato centrifugato a 10,000 rpm per 10 minuti e il supernatante utilizzato per la zimografia. Le proteine contenute sono state misurate sia nelle cellule che nei tessuti lisati con il metodo dell'acido bicinconinico. Campioni di mezzo condizionato (10 µl ciascuno) o di tessuto (150 µg) sono stati mescolati con un tampone di riferimento contenente 0.03% blu di bromofenolo, 0.4 mol/l Tris-HCl pH 7.4, 20% glicerolo, 5% SDS e separate su gel contenente 10% SDS-poliacrilammide e gelatina (1 mg/ml). Dopo la corsa elettroforetica, i gel sono stati sottoposti a lavaggio, per 1h, in una soluzione al 2.5% Triton X-100 e successivamente incubati per 4 h a 37°C in tampone d'incubazione contenente 50 mmol/l Tris, 200 mmol/l NaCl and 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5. I gel sono stati colorati con 0.05% Coomassie Brilliant Blue e decolorati con metanolo 30% e acido acetico 10%. Le zone chiare sullo sfondo indicavano l'attività proteolitica. Le MMPs sono state identificate confrontandole con le rispettive proteine ricombinanti (Calbiochem-Novabiochem) e con i pesi molecolari standard. L'analisi quantitativa è stata eseguita tramite densitometria (QuantityOne software, Bio-Rad).

#### ***Determinazione della densità dei capillari.***

La densità volumetrica dei capillari nel tessuto cicatriziale post-infartuato è stata misurata contando il numero dei vasi su sezioni semifini. Per ogni animale, sono stati fotografati dieci campi microscopici utilizzando un obiettivo 20X. Successivamente, su ciascuna immagine è stata sovrapposta una griglia quadrata, le cui celle avevano un lato di 30 µm, e contato il numero delle intersezioni della griglia con l'area (SA) dei microvasi. Le conte sono state effettuate da due diversi operatori.

#### ***Espressione di VEGF nel tessuto cardiaco.***

L'espressione del gene VEGF nel miocardio post-infartuato è stata valutata su campioni congelati tramite RT-PCR. L'RNA totale è stato estratto da tessuto omogeneizzato usando Trizol (Gibco-BRL) e quantificato mediante analisi allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260 nm. L'RNA totale (700µg) è stato poi retroscritto e

amplificato con il kit SuperScript One-Step™ RT-PCR System (Invitrogen, Groningen, NL). È stato sintetizzato cDNA per 30 min. a 55°C, pre-denaturato per 2 min. a 94°C e sottoposto a 35 cicli di PCR a 94°C per 15 sec., 57.3°C per 30 sec. e 72°C per 1 min.; l'estensione finale è stata effettuata a 72°C per 5 min. Come gene di riferimento è stato utilizzato l'mRNA della  $\beta$ -actina (temperatura di annealing: 55°C). Sono stati usati i seguenti primers: VEGF di topo (GenBank: M95200.1): up 5'-CAGGCTGCTGTAACGATGAA-3', down 5'-TTTCTCCGCTCTGAACAAGG-3'; VEGF porcino (GenBank: NM\_214084.1): up 5'-AGGAGTACCCCGATGAGATC-3', down 5'-GGGATTTTCTTGCCTCGCTC-3';  $\beta$  actina porcina (GenBank: NM\_031144): up 5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3', down 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCA-3'. Come previsto, la lunghezza dei frammenti amplificati era di 202, 200 e 539 paia di basi, rispettivamente, per VEGF di topo, e per VEGF e  $\beta$ -actina porcina. Gli amplificati della PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel al 2% di agarosio, colorato con bromuro di etidio.

#### ***Analisi della funzionalità cardiaca.***

Al fine di valutare la funzionalità contrattile ventricolare gli animali sono stati sottoposti a un Doppler ecocardiografico trans-toracico utilizzando l'eco cardiografo Philip ENvisor C. Le analisi sono state effettuate prima dell'intervento chirurgico, 1 mese dopo l'infarto miocardico (immediatamente prima dell'innesto cellulare) ed 1 mese dopo il trapianto delle cellule. Sono stati valutati parametri cardiaci quali il diametro di fine diastole e sistole del ventricolo sinistro (LVEDD e LVESD espresso in mm), la gittata cardiaca secondo il metodo di Simpson (EF espressa in percentuale), e l'indice di funzionalità miocardica (MPI), calcolata come il rapporto tra la somma della contrazione isovolumetrica in relazione al tempo di rilasciamento e il tempo della gittata cardiaca.

#### ***Analisi statistica.***

I dati sono stati rappresentati come la media  $\pm$  SEM di cinque animali per gruppo.

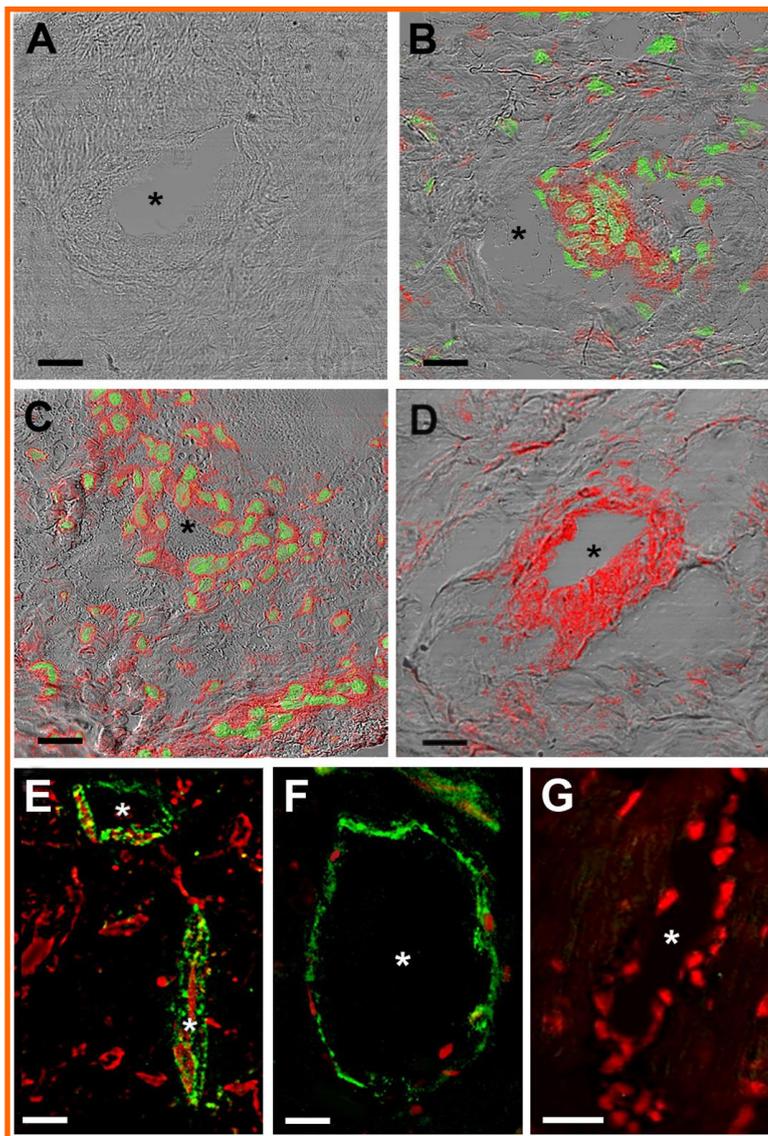
Tranne qualche caso, le differenze tra i diversi esperimenti sono stati valutati con il test ANOVA e con il test NEWMAN-KEULS. I calcoli sono stati eseguiti con il programma statistico Prism 4 (GraphPad, San Diego CA) .

## RISULTATI FASE I

### *Analisi morfologica della presenza di cellule mioblastiche nel miocardio post-infartuato*

Utilizzando anticorpi anti-GFP tramite immunofluorescenza accoppiata all'osservazione al microscopio confocale laser, è stato possibile evidenziare nel miocardio post-ischemico del cuore degli animali trapiantati, numerose cellule GFP-immunoreattive, sia C2C12/GFP e C2C12/RLX (Fig. 1A–C). La loro natura mioblastica è stata confermata dalla reattività all' $\alpha$ -actina sarcomerica specifica per le cellule muscolari scheletriche (Fig. 1D). Le cellule con caratteristiche immunologiche simili non sono mai state ritrovate nelle lesioni ischemiche dei cuori degli animali di controllo (infartuati ma non riceventi alcun trapianto cellulare). L'analisi al microscopio elettronico ha rilevato che il miocardio dei maiali riceventi C2C12/RLX conteneva un numero maggiore di mioblasti rispetto a quelli riceventi C2C12/GFP ( $83 \pm 12$  contro  $40 \pm 7$  cellule/campo microscopico; t-test student:  $P < 0.01$ ). In ambedue le condizioni sperimentali le cellule mioblastiche erano preferenzialmente localizzate attorno ai piccoli vasi o nelle loro immediate vicinanze, ed erano pressochè assenti nel miocardio non ischemico localizzato attorno alla cicatrice ischemica. L'endotelio vascolare dei vasi presenti nel contesto del miocardio post-infartuato, risultava positivo per le proteine di adesione leucocitaria ICAM-1 e VCAM (fig. 1E e F), ma non nel miocardio non-ischemico (Fig. 1G), suggerendo un suo ruolo nel processo di migrazione dei mioblasti nel tessuto danneggiato. Mediante immunoelettromicroscopia ed anticorpi anti-RLX, abbiamo potuto rilevare la presenza di cellule C2C12/RLX (Fig. 2). Le cellule, immunoreattive per RLX, come ci aspettavamo, non sono state trovate nei cuori trapiantati con C2C12/GFP (Fig. 2). Al microscopio elettronico a trasmissione, i mioblasti presenti nella cicatrice ischemica, potevano essere distinti dai fibroblasti per la presenza di una membrana basale discontinua e l'assenza di microfibrille collageniche in rapporto con la membrana plasmatica (fig. 3D). Comunque, i mioblasti trapiantati nel

miocardio post-ischemico rimanevano elementi singoli e non mostravano alcuna tendenza né a trans-differenziare verso un fenotipo cardiaco né a fondersi in miotubi multinucleati (Fig. 1 e 2). Questi dati suggerivano che i mioblasti C2C12 non erano in grado di generare tessuto contrattile nel sito di impianto, almeno nelle nostre condizioni sperimentali.



**Fig. 1 (A-D).** Microscopia confocale: immagini fluorescente e a contrasto differenziale sovrapposte; miocardio di controllo (A), miocardio trapiantato con C2C12/GFP (B) e miocardio trapiantato con C2C12/RLX (C). I mioblasti sono stati identificati mediante la loro reattività all'anticorpo anti-GFP (rosso); i nuclei sono stati contro colorati con Syto 3 (verde). In (D) le sezioni sono marcate con anticorpo anti  $\alpha$ -actina sarcomerica. I cuori riceventi mioblasti mostrano la presenza di cellule immunoreattive nella zona post infartuata, principalmente in prossimità dei piccoli vasi (asterischi). Nessuna cellula mioblastica è presente nelle sezioni di controllo. Un numero maggiore di mioblasti trapiantati è visibile nelle sezioni di cuori provenienti da animali inoculati con C2C12/RLX rispetto a quelli presenti in cuore di animali inoculati con le sole C2C12. (E-G): microscopia confocale di sezioni di cuore inoculato con C2C12 /RLX ed immuno marcate per V-CAM (E) e ICAM (F-G). Entrambe le molecole (verde) sono espresse dalle cellule endoteliali dei microvasi nella zona post-infartuata (E,F); al contrario nessuna colorazione positiva per ICAM è osservabile nel circostante miocardio circondante la lesione ischemica. I nuclei sono contrastati con ioduro di propidio (rosso).

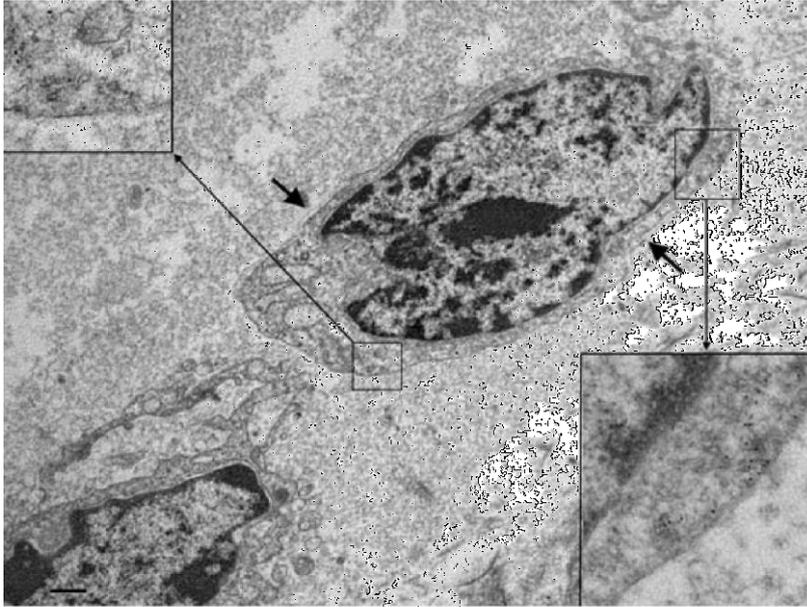


Fig A

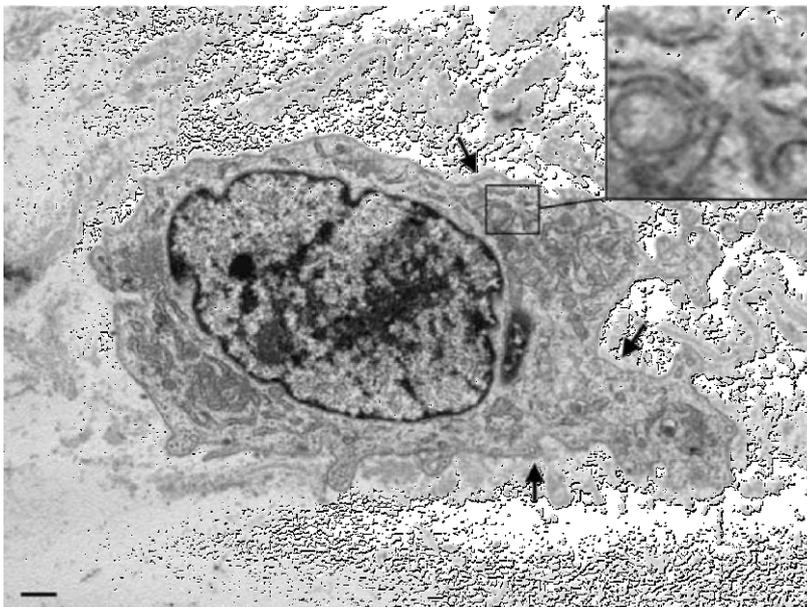
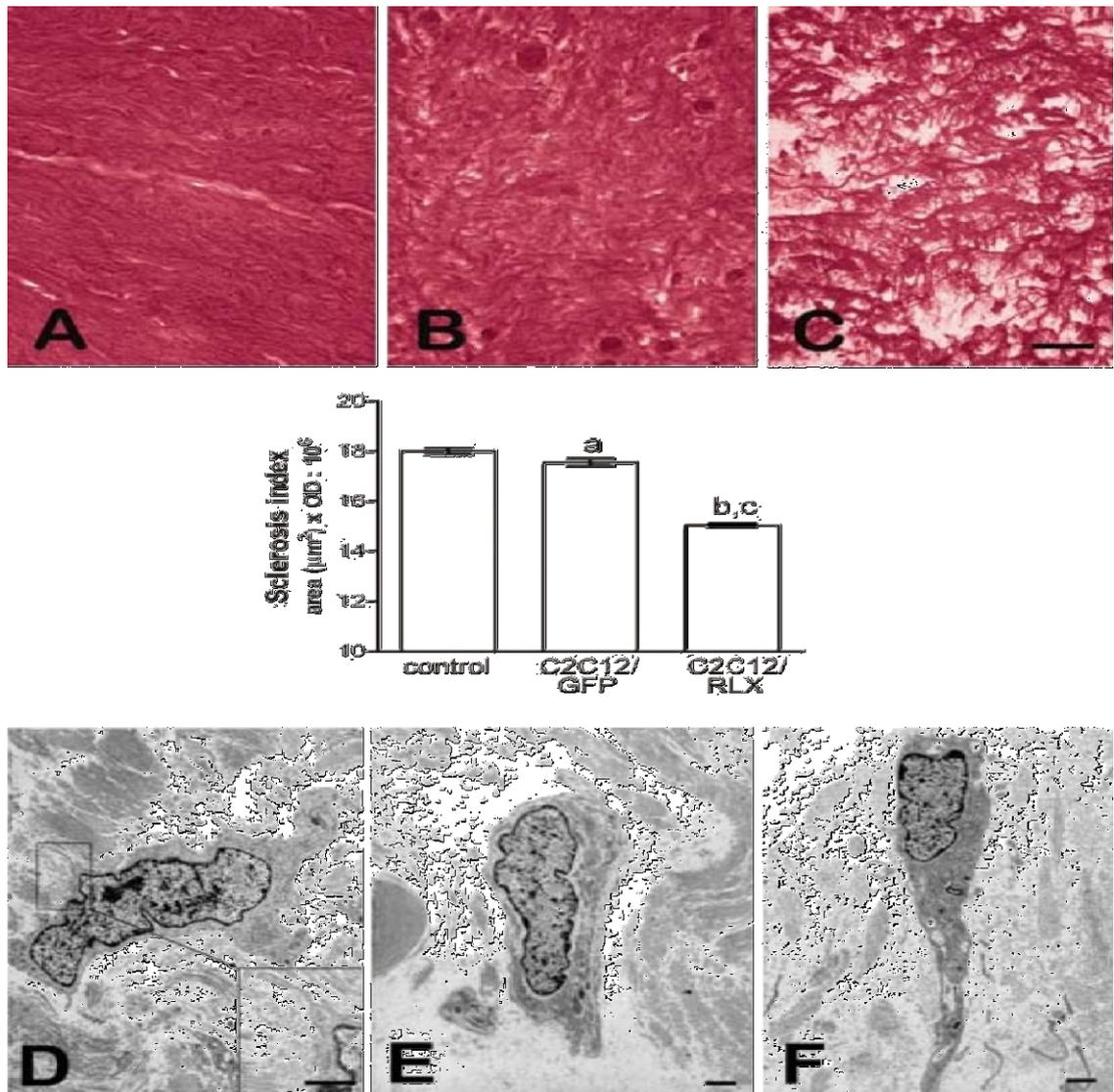


Fig B

**Fig. 2.** Immunolettromicroscopia su sezioni di tessuto proveniente da cuore di animali inoculati con mioblasti C2C12/RLX (A) e C2C12/GFP (B). Le sezioni sono state incubate con anticorpo anti-RLX e successivamente con anticorpi secondari coniugati a particelle di oro colloidale di diametro di 5 nm. Nel riquadro più alto la RLX è presente nel citoplasma del mioblasto, al contrario nessuna marcatura è visibile, nel riquadro in basso, nei mioblasti C2C12/GFP. In entrambi i casi, le cellule sono circondate da una membrana basale discontinua e sono immerse in una matrice extracellulare particolarmente elettronelucente.



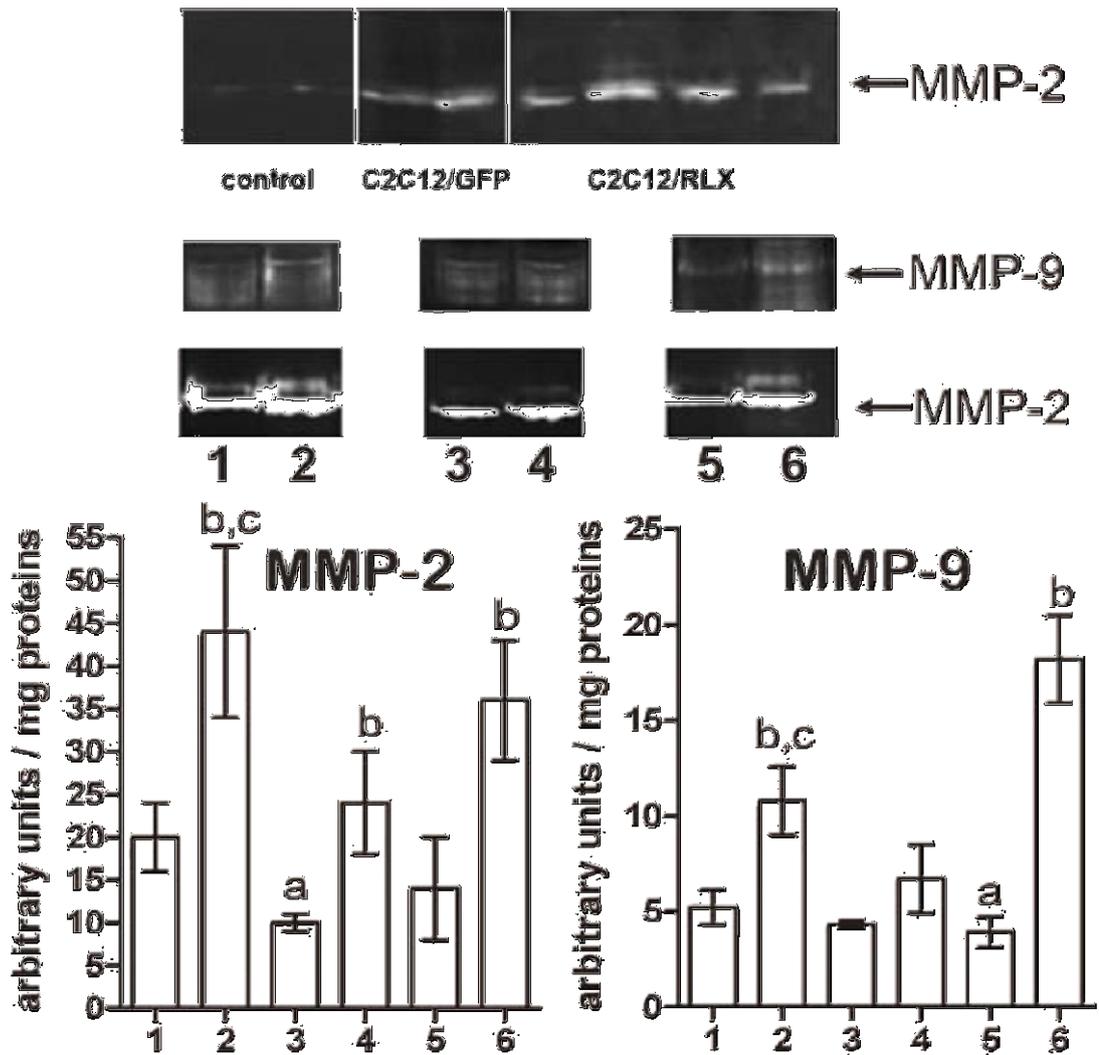
**Fig. 3. Pannelli superiori.** Microscopia ottica su sezioni di miocardio di controllo (A) inoculato con C2C12/GFP (B) e inoculato con C2C12/RLX (C), marcate con il metodo di Van Gieson per rivelare le fibre collageniche. Una marcata riduzione dell'estensione della fibrosi può essere notata nelle cicatrici ischemiche dei cuori trapiantati con i mioblasti; da notare che la fibrosi è particolarmente attenuata nelle sezioni dei cuori che hanno ricevuto cellule C2C12/RLX.

*Pannello centrale* L'indice morfologico computerizzato della sclerosi (densità ottica per volume di fibre collageniche) nel miocardio post- infartuato: (a)  $P < 0.05$  vs controlli (b)  $P < 0.001$  vs controlli; (c)  $P < 0.001$  vs C2C12/GFP.

*Pannelli inferiori* Immagini di microscopia elettronica a trasmissione che rileva le caratteristiche ultrastrutturali di fibroblasti presenti nella matrice del miocardio di controllo (D), inoculato con C2C12/GFP (E) e C2C12/RLX (F). Nel controllo, le microfibrille di collagene formano fasci piuttosto voluminosi ed evidenti attorno alla membrana plasmatica dei fibroblasti (riquadro), le microfibrille di collagene sono sottili e diffuse nel contesto della matrice extracellulare che circonda i fibroblasti presenti nel miocardio post-ischemico di animali inoculati con C2C12/GFP. Al contrario le fibrille risultano particolarmente diffuse e distese (F), nel miocardio ricevente C2C12/RLX.

### ***Rimodellamento della matrice extracellulare e densità dei capillari nel miocardio post-infartuato***

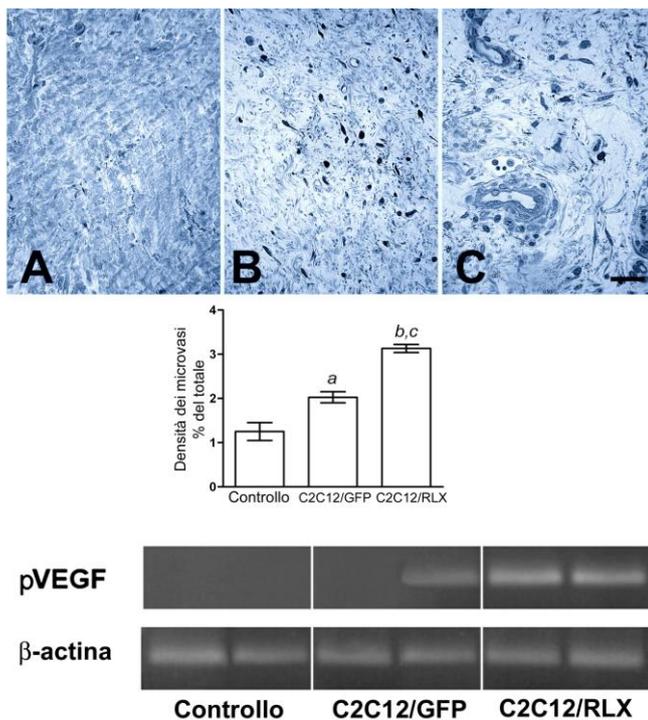
Attraverso la colorazione istochimica di Van Gieson è stato possibile rilevare che le fibre collagene erano densamente accumulate nel miocardio post-infartuato degli animali controllati; risultavano inoltre sensibilmente ridotte nei gruppi trapiantati, specialmente negli animali riceventi C2C12/RLX (Fig. 3 A e C). L'analisi morfometrica del contenuto di tessuto collagene confermava queste osservazioni (Fig. 3). Al microscopio elettronico, nel miocardio post-ischemico di cuori di controllo, i fibroblasti si mostravano attivati, con citoplasma pieno di organelli, ed erano circondati da fasci di fibre collageniche notevolmente spesse (Fig. 3D). Contrariamente, nel miocardio post-infartuato dei cuori riceventi C2C12/RLX, i fibroblasti erano immersi in una matrice extracellulare lassa con poche e sottili fibrille di collagene (Fig. 3E). Abbiamo quindi analizzato l'attività degli enzimi degradanti la matrice, MMP/collagenasi, nella cicatrice post-infarto, come pure nelle co-culture di cellule cardiache e C2C12/GFP o C2C12/RLX. L'attività MMP-2 risultava molto bassa nei cuori di controllo, mentre era significativamente aumentata in quelli contenenti le cellule C2C12/GFP e C2C12/RLX ( $P < 0.01$ ). Abbiamo inoltre osservato una tendenza dei cuori impiantati con C2C12/RLX a possedere una maggiore attività MMP-2 rispetto a quelli con C2C12/GFP, anche se la differenza non ha raggiunto una significatività statistica. Inoltre, abbiamo dimostrato che entrambe le co-culture rilasciavano nel mezzo di coltura notevoli quantità di metalloproteasi ed i livelli di queste ultime erano maggiori nelle co-culture con C2C12/RLX (Fig. 4). Abbiamo altresì rilevato che, sia le cellule cardiache che i mioblasti trapiantati contribuivano all'attività MMP e questo effetto era significativamente annullato in presenza di RLX endogena ed esogena (Fig. 4).



**Fig. 4** Pannello superiore. Attività delle metalloproteasi di matrice (MMP) valutata tramite zimografia in campioni di tessuto cardiaco di controllo (n=2, densità ottica: 36±1), in miocardio di maiali trapiantati con C2C12/GFP (n=2, densità ottica: 92±4) e con C2C12/RLX (n=4, densità ottica: 106±13). Pannello centrale e inferiore. Attività delle MMP nel mezzo condizionato da colture primarie di cellule cardiache di maiale co-cultivate con cellule C2C12/GFP (1) o mioblasti C2C12/RLX (2), colture primarie di cellule cardiache di maiale incubate con terreno(3) o con H2 RLX (4), C2C12/GFP (5) e C2C12/RLX (6). Analisi densitometrica dell'attività delle MMP espressa come unità arbitraria di densità ottica normalizzata al contenuto proteico. I pesi molecolari delle bande di lisi del collagene sono in accordo con MMP-9 e MMP-2. La transfezione o il trattamento con RLX up-regola l'attività delle MMP-2. (a),  $P < 0.05$  versus co-culture di cellule cardiache e C2C12/GFP; (b)  $P < 0.05$  versus le controparti senza RLX; (c)  $P < 0.05$  versus cellule cardiache trattate con RLX esogena.

Infine abbiamo studiato la vascolarizzazione dei tessuti miocardici post-ischemici cicatrizzati. Nei cuori trapiantati con C2C12/GFP, la densità dei microvasi era leggermente, ma significativamente aumentata, rispetto al gruppo di controllo, e raggiungeva valori più alti in quelli riceventi C2C12/RLX (Fig. 5). In modo interessante, i cambiamenti nella densità microvascolare erano accompagnati da variazioni nella espressione dell' mRNA per il VEGF (Fig. 5). Infatti, i livelli di VEGF mRNA erano praticamente assenti nei cuori di controllo, leggermente espressi nei cuori inoculati con C2C12/GFP, e ben rilevabili nel miocardio post-ischemico dei cuori inoculati con C2C12/GFP (tabella 1).

Dall'altro lato, la presenza del trascritto murino per il VEGF non è stata rilevata nei campioni istologici provenienti dagli animali trapiantati, suggerendo che mioblasti i inoculati non contribuiscono sostanzialmente alla produzione locale di VEGF nel miocardio ischemico.



**Fig. 5.** Pannelli superiore e centrale. Microscopia ottica di sezioni semifini di cuori di controllo (A), di cuori trapiantati con C2C12/GFP (B) e con C2C12/RLX (C), ed analisi morfometrica della densità dei microvasi. Sia i cuori inoculati con C2C12/GFP che con C2C12/RLX mostrano una densità micro vascolare più elevata rispetto a quella dei cuori di controllo. Da notare che i cuori inoculati con C2C12/RLX mostrano una densità microvascolare significativamente maggiore rispetto a quelli inoculati con C2C12/GFP. (a)  $P < 0.05$  vs controllo; (b)  $P < 0.01$  vs controllo (c)  $P < 0.05$  vs C2C12/GFP. Pannello inferiore. Saggio dell' RT-PCR per i trascritti del VEGF porcino nei campioni di tessuto cicatriziale dei cuori di controllo (linea 1,2), dei cuori trapiantati con C2C12/GFP (linee 3,4) e con C2C12/RLX (linee 5,6). Le immagini sono rappresentative di cinque differenti animali per punto sperimentale. VEGF mRNA porcino è assente nei campioni di controllo, scarsamente espresso in uno dei due campioni di cuore trapiantato con C2C12/GFP e chiaramente riscontrabile in entrambi i campioni di cuore trapiantati con C2C12/RLX.

Tabella 1. Espressione del VEGF mRNA nel tessuto cicatriziale cardiaco post-infarto

Animal No.	Controls	C2C12/GFP	LX	C2C12/R
1	-	-		++
2	-	+		+++
3	-	-		++
4	-	-		+++
5	-	-		+

Valutazione semiquantitativa dell'intensità delle bande degli amplificati di RT-PCR per VEGF porcino

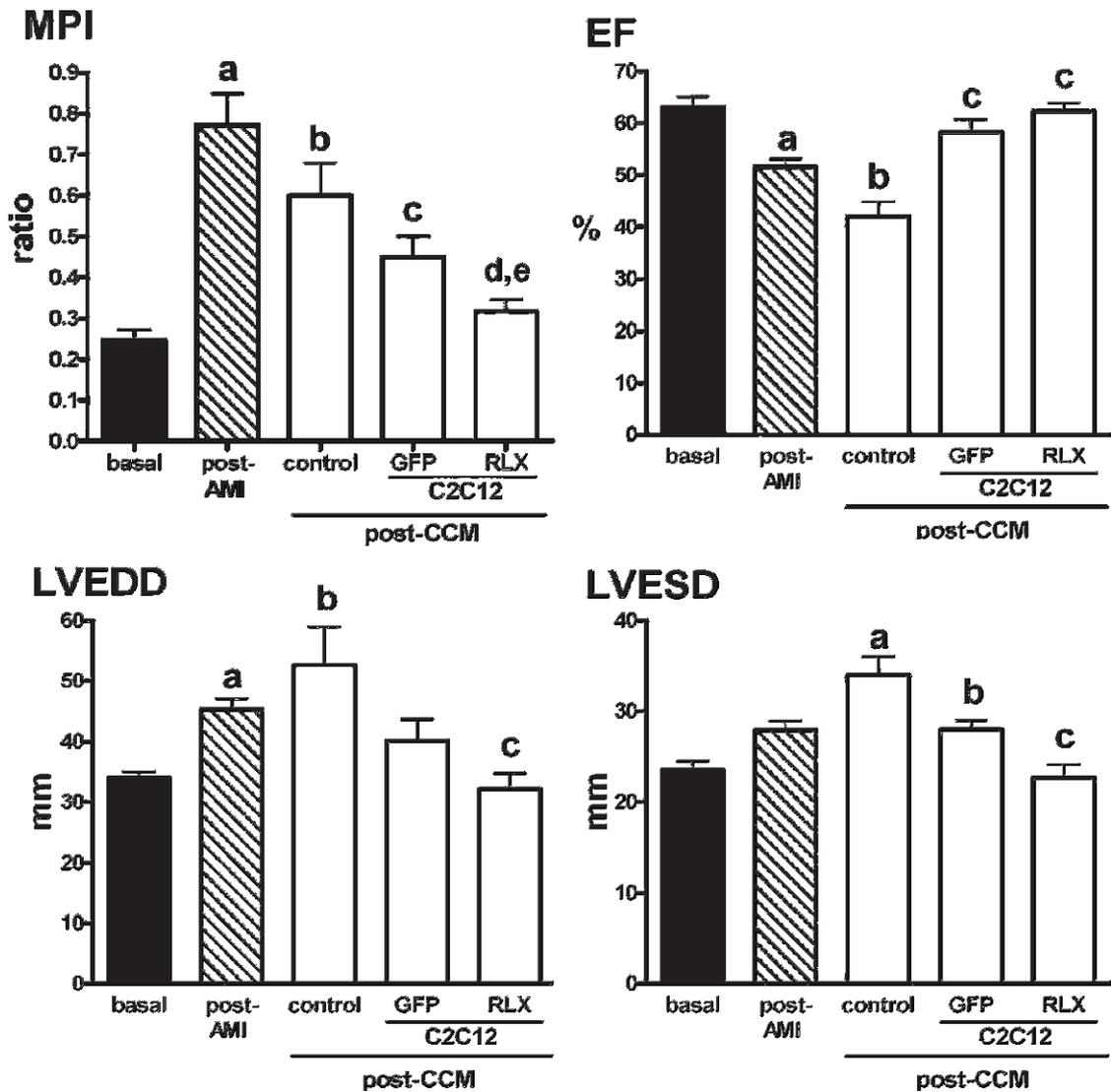
### ***Livelli plasmatici e tissutali di RLX***

Mediante ELISA non è stato possibile rilevare la presenza di RLX nel sangue nè nei campioni tissutali di animali trapiantati con C2C12/GFP. Nei campioni di cuori di maiale, inoculati con C2C12/RLX tale ormone è stato dosato, anche se a livelli molto bassi ( $85 \pm 12.3$  pg/ml), nei tessuti cardiaci post-infartuati ma non nel sangue.

### ***Funzionalità cardiaca dopo il trapianto cellulare***

Abbiamo infine investigato tramite l'analisi ecocardiografica, se la colonizzazione del miocardio post-ischemico da parte delle cellule mioblastiche era associata ad un miglioramento della performance contrattile del cuore post-infartuato. In condizioni basali, prima dell'infarto sperimentale, gli animali di tutti i gruppi mostravano valori simili di MPI (indice di performance miocardica), EF (gittata cardiaca) e diametro ventricolare sinistro (Fig. 6). Un mese dopo l'inoculo dei mioblasti, l'area post-infartuata aveva un'estensione paragonabile in tutti i gruppi di animali e coinvolgeva i segmenti anteroseptali e apicali. L'MPI, che è inversamente proporzionale all'indebolimento della funzione ventricolare, come pure LVEDD e LVESD sono stati rilevati marcatamente aumentati, mentre EF significativamente diminuito rispetto ai valori di base (Fig. 6). Un mese dopo il trapianto cellulare, MPI era molto aumentato, EF aumentato e LVEDD e LVESD erano leggermente ridotti in tutti i gruppi trapiantati rispetto ai controlli. È interessante notare che l' MPI nei cuori riceventi C2C12/RLX era

significativamente più basso rispetto a quello dei cuori riceventi C2C12/GFP, mentre gli altri parametri testati erano incrementati, anche se i loro valori non raggiungevano la significatività statistica con solo 5 animali per gruppo (Fig. 6). Nell'insieme, questi dati indicano che le cellule mioblastiche presenti nella cicatrice post-infartuata sono capaci di migliorare la performance contrattile miocardica del cuore dopo infarto.



**Fig. 6.** Indice di funzionalità miocardica (MPI), gittata cardiaca (EF), diametro di fine diastole e sistole del ventricolo sinistro (LVEDD, LVESD) valutate in condizioni basali (barre nere), un mese dopo l'induzione dell'infarto miocardico (post-AMI; barre a strisce) e un mese dopo l'inoculo cellulare (dopo cardiomioplastica cellulare [CCM]; barre bianche). L'inoculo di mioblasti migliora la funzionalità cardiaca. I mioblasti C2C12/RLX sono più efficaci di quelli C2C12/GFP. Differenze significative (test di ANOVA): MPI: (a)  $P < 0.001$  vs basale; (b)  $P < 0.001$  vs post-AMI; (c)  $P < 0.01$  vs controlli; (d)  $P < 0.001$  vs controlli; (e)  $P < 0.05$  vs C2C12/GFP. EF: (a)  $P < 0.01$  vs basali; (b)  $P < 0.001$  vs post-AMI; (c)  $P < 0.001$  vs controlli. LVEDD: (a)  $P < 0.05$  vs basali; (b)  $P < 0.01$  vs basali; (c)  $P < 0.01$  vs controllo. LVESD: (a)  $P < 0.01$  vs basali & post-AMI; (b)  $P < 0.05$  vs controlli; (c)  $P < 0.001$  vs controlli.

## DISCUSSIONE FASE I

È ben noto che il miocardio dopo ischemia va incontro ad una serie di eventi che coinvolgono la morte cellulare con conseguente reazione infiammatoria e formazione di una cicatrice fibrosa<sup>94</sup>. Quest'ultima causa, nel miocardio attorno alla lesione, un sostanziale aumento del carico meccanico e funzionale che si accompagna ad un rimodellamento della parete ventricolare. Recentemente, la rigenerazione miocardica basata sull'inoculo di cellule staminali è stata vista come un potenziale strumento terapeutico per limitare il deleterio processo di rimodellamento post-infarto. Teoricamente, due distinti meccanismi possono essere coinvolti nell'abilità delle cellule trapiantate di provocare un miglioramento della contrazione cardiaca: la trans-differenziazione delle cellule progenitrici in tessuti miocardici e/o vascolari, e la secrezione di fattori solubili che esercitano effetti paracrini nei confronti del tessuto ospite. Il presente studio ha rilevato che mioblasti scheletrici inoculati per via venosa retrograda nel seno coronarico di cuore di maiale sottoposti ad infarto sperimentale, sono capaci, una volta raggiunta la zona post-infartuata, di promuovere un intenso rimodellamento della matrice extracellulare (i.e. riduzione delle fibre collageniche e neangiogenesi) favorendo in tal modo la funzionalità cardiaca. Nel presente studio, infatti l'inoculo dei mioblasti, determina un miglioramento della funzionalità del cuore post-infartuato grazie all'azione paracrina che essi stessi esercitano sul miocardio, consistente principalmente nell'attenuazione del deposito di fibre collagene e nell'aumento della rete microvascolare nella cicatrice ischemica. I benefici funzionali del trapianto di mioblasti, in particolare quelli geneticamente modificati per l'espressione in "situ" di RLX, sono stati dimostrati dall'incremento degli indici ecocardiografici e dei parametri della performance cardiaca evidenziati negli animali trapiantati. In particolare, l'utilità del MPI (miocardial performance index) nella predizione della funzionalità ventricolare sinistra, è stata dimostrata in una larga coorte di pazienti con infarto miocardio<sup>95</sup> ed ha mostrato riprodurre fedelmente i parametri funzionali contrattili misurati utilizzando metodi invasivi tramite cateteri<sup>92,93</sup>. Queste scoperte

confermano ed estendono i risultati dei precedenti studi sull'abilità delle cellule trapiantate di esercitare azioni pro-angiogenetiche e cardio-protettive nel miocardio ischemico e avallando l'idea che altri meccanismi indipendenti dalla trans-differenziazione miocardica possano contribuire ad incrementare la funzionalità cardiaca<sup>82,96</sup>. In particolare, abbiamo dimostrato che l'inoculo di cellule mioblastiche C2C12 attraverso la via venosa retrograda, in cuori di maiale post- infartuati, garantisce una distribuzione selettiva di tali cellule nei tessuti danneggiati. Dal momento che queste cellule sono state principalmente evidenziate intorno ai microvasi che mostrano un endotelio permissivo, esprimente cioè molecole di adesione endoteliale come ICAM-1 e VCAM, è possibile che i fattori che controllano il processo infiammatorio nel miocardio post-infarto<sup>97</sup> possono avere un ruolo nella migrazione dei mioblasti dal circolo sanguigno nell'interstizio connettivale. Il nostro studio non ha evidenziato nessuna tendenza dei mioblasti inoculati ad assumere un fenotipo simil-cardiaco, in accordo con i dati recenti della letteratura<sup>80</sup>. Tuttavia la loro presenza nell'area fibrotica è stata associata ad un significativo rimodellamento della matrice extracellulare e ad un incremento della densità microvascolare, a suggerire che queste cellule erano in grado di modificare le proprietà elastiche e trofiche del miocardio post-infartuato. I mioblasti scheletrici, over esprimenti RLX, risultavano garantire un aumento dei benefici funzionali rispetto all'inoculo di mioblasti wild tipe. Questo concorda con i precedenti studi che hanno dimostrato che l'RLX è un potente agente antifibrotico, capace di ridurre l'estensione della fibrosi e indurre il rimodellamento della matrice extracellulare in vari organi, incluso il cuore grazie ad un aumento del turn over del collagene ed ad un' incrementata attività delle metalloproteasi<sup>84,86,99</sup>. L'utilizzo delle cellule over esprimenti RLX può essere vantaggiosa rispetto alla somministrazione di RLX esogena, in quanto può consentire di ottenere livelli locali, costanti e biologicamente efficaci di questo ormone; in tal modo, l' RLX può avere effetto sinergico con altri fattori paracrini rilasciati in situ dai mioblasti trapiantati. I continui cambiamenti nella composizione della matrice extracellulare durante l'evoluzione dell'infarto possono cambiare le proprietà fisiche della cicatrice e portare ad una maggiore compliance ventricolare, ridotto stress miocardico e soprattutto miglioramenti delle funzionalità cardiache.

Molte evidenze sperimentali riportate in letteratura convergono verso questa interpretazione: (i) l'inoculo di cellule mesenchimali in miocardio ischemico acuto riduce la dilatazione ventricolare influenzando la fibrosi e le proprietà elastiche dell'area infartuata<sup>83</sup>; (ii) l'inibizione della proteina chemoattrattiva per i monociti attenua le disfunzioni miocardiche post-infarto, diminuendo la fibrosi cardiaca<sup>100</sup>; e (iii) i mioblasti scheletrici inoculati nel miocardio danneggiato influenzano il rimodellamento del collagene nelle zone infartuate<sup>90</sup>. L'incremento della densità microvascolare nella cicatrice cardiaca post-infartuata può fornire benefici addizionali al rimodellamento della matrice, contribuendo alla creazione di un più favorevole microambiente capace di aumentare la sopravvivenza delle cellule trapiantate, riducendo la rigidità della cicatrice e prevenendo l'apoptosi cardiomiocitaria nel tessuto miocardico peri-infarto. Ciò può contribuire alla spiegazione dell'alto numero di C2C12/RLX trapiantate e sopravvissute rispetto alle C2C12/GFP osservate nel presente studio. Da notare inoltre che, nel nostro studio, il trapianto di mioblasti C2C12/RLX non è correlabile ai livelli ematici rilevabili di RLX, portandoci in tal modo, ad escludere possibili effetti sistemici di questo ormone. Degni di rilevanza sono gli studi che hanno riportato che l'RLX esercita una significativa azione angiogenetica e antifibrotica soltanto in organi e tessuti danneggiati, lasciando inalterati quelli in condizioni normali<sup>101,102</sup>. Il paradigma di una protezione paracrina che le cellule trapiantate svolgerebbero sul miocardio post-infartuato, è supportato dall'osservazione che i mioblasti C2C12/GFP e più efficacemente le cellule C2C12/RLX erano capaci di aumentare l'attività delle MMP e l'espressione del VEGF nelle cellule cardiache. Le MMP, in particolare, sono coinvolte nel turnover della matrice extracellulare, sia in condizioni fisiologiche che in risposta a stimoli infiammatori<sup>103</sup>; esse giocano inoltre un ruolo nella migrazione dei mioblasti e nella loro fusione durante la rigenerazione<sup>104</sup> e lo sviluppo muscolare, nell'invasione del miocardio infartuato da parte delle cellule infiammatorie durante le prime fasi di riparazione<sup>105</sup> e nella dilatazione e rimodellamento ventricolare post-infarto<sup>106</sup>. Su queste basi, l'attivazione delle MMP e la seguente attenuazione della rigidità della cicatrice possono spiegare le maggiori potenzialità di migrazione e di colonizzazione della cicatrice da parte dei

mioblasti C2C12/RLX rispetto ai C2C12/GFP. Il VEGF, inoltre, risulta essere un promotore chiave dell'angiogenesi giocando un ruolo focale nella CCM.<sup>107,108</sup> L'importanza del VEGF nella CCM è stata evidenziata in modelli animali di infarto miocardio cronico.

In effetti, un aumento dell'espressione di questo fattore è stato associato ad un miglioramento della performance cardiaca dopo inoculo intracoronarico di cellule staminali mesenchimali. Nel nostro studio, i livelli dell'mRNA per VEGF nella cicatrice cardiaca, si correlano al grado di densità microvascolare, che risultava essere più alta nei cuori inoculati con C2C12/RLX che mostravano possedere una rete vascolare più estesa. Questi risultati sono coerenti con le note proprietà vascolari della RLX, capace di indurre vasodilatazione coronaria, sostenere il flusso coronario, ed indurre neoangiogenesi ed espressione di VEGF<sup>85,99,101</sup>.

In conclusione, il nostro studio suggerisce che, il miglioramento della funzionalità cardiaca dopo il trapianto di mioblasti nel miocardio di maiale post-infartuato, è principalmente dovuto all'azione paracrina delle cellule inoculate piuttosto che alla trans-differenziazione di queste cellule verso un fenotipo simil-cardiaco. Tale effetto sembra dipendere da fattori locali, quali l'MMP e il VEGF, che rilasciati dalle cellule che colonizzano il miocardio ischemico e da quelle proprie del microambiente tissutale, sono capaci di influenzare la rigidità e la vascolarizzazione della cicatrice ischemica, inducendo il rimodellamento della matrice extracellulare e neoangiogenesi. Il nostro studio suggerisce inoltre che le cellule mioblastiche geneticamente modificate per l'espressione in "situ" di RLX possono comportarsi come risorsa endogena di RLX nel miocardio ischemico, aumentando sostanzialmente i benefici ottenuti con il trapianto di mioblasti wild type.

## INTRODUZIONE FASE II

I dati della prima fase ci suggerivano che i mioblasti scheletrici erano in grado di influenzare positivamente il recupero funzionale del miocardio post-infartuato, pur non contribuendo essi stessi a rigenerare il tessuto lesa.

Nel tentativo di estendere le potenzialità benefiche e terapeutiche di queste cellule nel campo della cardiomioplastica cellulare, abbiamo successivamente condotto uno studio in vitro, allo scopo di valutare se i mioblasti scheletrici potevano influenzare la proliferazione e il differenziamento di cellule staminali cardiache. Questo sulla base di una crescente consapevolezza che il cuore non è un organo post-mitotico; infatti, negli ultimi dieci anni, vari studi hanno messo in evidenza l'esistenza nel cuore umano di cellule staminali cardiache, le quali, una volta attivate, sono in grado di rientrare nel ciclo cellulare e differenziare in nuovi cardiomiociti e vasi<sup>110,111,112,113</sup>. Le cellule cardiache staminali primitive, allo stato quindi quiescente e indifferenziato, sono caratterizzate dall'espressione di Oct-4, marker di totipotenza; una volta attivate diventano Oct-4<sup>neg</sup> e cKit<sup>pos</sup> quindi multipotenti, per poi andare incontro a successive proliferazioni che determinano l'induzione da parte delle cellule stesse di fattori di trascrizione specifici per la linea cardiaca (GATA4, ETS1, GATA6) e differenziando quindi in una delle tre linee cellulari cardiache: cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce<sup>114</sup>.

Numerose evidenze sperimentali dimostrano che le cellule cardiache possono essere attivate sia da stimoli fisiologici<sup>115</sup> che patologici<sup>116</sup> tramite un *pathway* paracrinomediato. I cardiomiociti infatti, in risposta allo stress, producono citochine e fattori di crescita per i quali le cellule staminali cardiache presentano specifici recettori, recettori su cui agiscono anche le stesse molecole segnale prodotte dalle cellule cardiache staminali (modalità autocrina)<sup>117</sup>.

Diversi studi dimostrano la presenza di cellule proliferanti a livello cardiaco, caratterizzati dall'espressione di geni di crescita precoci e tardivi, specifici per i cardiomiociti, subito dopo l'infarto. E' stato osservato inoltre l'aumento di ciclica E, A,

B e il parallelo incremento dell'attività chinasi<sup>111</sup>. In aggiunta, sono stati identificati elevati livelli di DNA in fase di replicazione, cariocinesi e citocinesi<sup>111,112,113</sup>.

L'esistenza quindi di cellule staminali cardiache e la comprensione dei meccanismi coinvolti nel loro reclutamento, potrebbero portare allo sviluppo di approcci rigenerativi alternativi per il trattamento del cuore post-infartuato.

## **MATERIALI E METODI FASE II**

### ***Colture cellulari e co-culture.***

Colture primarie di cardiomiociti ventricolari di topo sono state ottenute da topi neonati (Harlan, Corezzana, Italia) di 1-2 giorni. Mioblasti scheletrici di topo C2C12 sono stati transfettati con vettore lentivirale esprimente la preprorelassina umana 2 cDNA ed il gene per enhanced green fluorescent protein (eGFP), o eGFP sotto un promotore virale CMV e denominate C2C12/RLX e C2C12/GFP, rispettivamente. Il 2° giorno il supernatante delle colture cellulari con C2C12/RLX conteneva circa  $1,8 \pm 0,2$  ng/ml di RLX, come valutato tramite la tecnica ELISA<sup>134</sup>. Il giorno dell'isolamento, cardiomiociti e mioblasti sono stati co-coltivati in rapporto di 1:3 in DMEM contenente il 2% di siero di cavallo e piastrati su vetrini coprioggetto precedentemente trattati con gelatina. Per identificare le cellule C2C12 in coltura, queste sono state marcate con nanocristalli fluorescenti (Qtracker 605, Invitrogen, Eugene, OR) per 60 minuti a 37 °C prima della piastratura. Come controllo sono state utilizzate monoculture di cardiomiociti cresciuti nel medesimo terreno di coltura. Monoculture e co-culture sono state studiate a 24, 48 e 72 ore dalla piastratura. In alcuni esperimenti, RLX umana ricombinante (gentilmente procurata dal Dr. Mario Bigazzi, Istituto Prosperius, Firenze) è stata aggiunta alle singole colture di cardiomiociti o alle co-culture di cardiomiociti e C2C12/GFP ad una concentrazione finale di  $10^{-9}$  M, la stessa quantità rilasciata nel terreno di coltura da C2C12/RLX. In esperimenti paralleli, alle co-culture di cardiomiociti e C2C12/RLX sono stati aggiunti anticorpi anti-RLX (Immundiagnostik, Bensheim, Germania) ad una concentrazione finale di  $10^{-7}$  M.

### ***Microscopia confocale.***

Cellule fissate in paraformaldeide sono state incubate con i seguenti anticorpi primari: rabbit anti-peptide natriuretico atriale (ANP; 1:50; Santa Cruz, Milano, Italia); mouse anti-troponina T cardiaca (cTnT; 1:100; LabVision, Fremont, CA); rabbit anti-HCN4

(1:100; Santa Cruz); mouse anti-Cx43 (1:200; Chemicon, Temecula, CA). L'immunoreazione è stata rivelata usando anticorpi secondari anti-mouse od anti-rabbit coniugati con Alexa488 (1:100; Molecular Probes, Eugene, OR). I nuclei sono stati contrastati con ioduro di propidio (Molecular Probes). La fluorescenza è stata rivelata con un microscopio confocale a scansione laser (Leica Microsystem, Mannheim, Germania) dotato di obiettivo Leika PlanApo X63 oil-immersion, di una sorgente laser e a HeNe/Argon per la fluorescenza e di un sistema ottico di contrasto interferenziale (DIC) per le immagini in trasmissione. Una serie di sezioni ottiche (1024X1024 pixels) ad intervalli di 0,8  $\mu\text{m}$  sono state ottenute e sovrapposte per creare una singola immagine composita. L'analisi densitometrica riguardante l'intensità dell'immuno-marcatura dei marker considerati è stata eseguita su immagini digitali delle colture usando il programma per l'analisi dell'immagine Scion Image Beta 4.0.2 ( Scion, Frederick, MD). Al fine di quantificare l'espressione della Cx43 all'interno degli aggregati di cardiomiociti, è stata valutata la densità ottica della Cx43. E' stata presa in considerazione un'area di 100  $\mu\text{m}^2$  in cui sono stati misurati 5 volumi d'interesse (VOI) di spessore 6  $\mu\text{m}$  in ogni volume di scansione confocale: 5 volumi di scansione confocali sono stati selezionati casualmente per ogni condizione sperimentale. E' stata successivamente calcolata la densità ottica. media  $\pm$  SE. La valutazione morfometrica dell'estensione dei cluster cellulari, propaggini e nanotubi, è stata ottenuta su immagini a DIC con un obiettivo X63, 10 per ogni gruppo sperimentale, utilizzando il programma *open source* ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

### ***MitoTracker.***

I cardiomiociti in monocultura sono stati marcati con MitoTracker Red FM (1 $\mu\text{M}$ , Molecular Probes) per 30 minuti, come descritto precedentemente<sup>135</sup>. Questo colorante viene incorporato nelle cellule e può essere utilizzato per visualizzare la mobilità di organelli intracellulari. Dopo il caricamento, i cardiomiociti sono stati sciacquati e osservati al microscopio confocale a vari tempi (0, 30 min, 6 h, 24 h).

### ***Microscopia elettronica a trasmissione.***

I cardiomiociti, cresciuti per 48 ore, sono stati centrifugati ed il pellet ottenuto fissato in glutaraldeide al 4% e post-fissati in osmio tetraossido all'1%, infine inclusi in Epon 812. Le sezioni ultrafini sono state contrastate con acetato di uranile e bismuto alcalino subnitrito ed analizzate al microscopio elettronico JEM 1010 (Jeol, Tokyo, Giappone) a 80 kV.

### ***RT-PCR per il recettore della RLX RXFP1.***

L'RNA totale è stato estratto da muscolo cardiaco, mediante TRIAGENT (Sigma) secondo protocollo, retroscritto ed amplificato tramite SuperScript One-Step™ RT-PCR System (Invitrogen, Groningen, NL). Sono stati utilizzati i seguenti primer e parametri di amplificazione: RXFP1 (NM\_212452.1), *forward* ACG AGC TGT CCC ATC AGT TT, *reverse* ATG TGC TGA CAG AGG GGT TT, temperatura di annealing: 55.3 °C;  $\beta$ -actina (NM\_007393.3), presa come gene di controllo *housekeeping*, *forward* ACT GGG ACG ACA TGG AGA AG, *reverse* ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA, temperatura di annealing: 57.3 °C. I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel di agarosio al 2% mediante elettroforesi e visualizzati al transilluminatore mediante marcatura con bromuro d'etidio.

### ***Ca<sup>2+</sup> imaging.***

La mobilizzazione e il trasferimento di Ca<sup>2+</sup> intra ed inter-cellulare è stata monitorata misurando la fluorescenza del Fluo-3 AM (Molecular Probes). I cardiomiociti e i mioblasti sono stati co-coltivati per 24 h e poi caricati con 10  $\mu$ M di Fluo-3 e 0,01% (p/v) di Pluronic F-127 (Molecular Probes). La propagazione intercellulare di Ca<sup>2+</sup> è stata monitorata in immagini in fluorescenza acquisite con il microscopio confocale Leica (lunghezza d'onda di eccitazione: 488 nm; lunghezza d'onda di emissione: 510 nm). Le immagini digitali sono state acquisite ogni 0,35 sec mediante un software di analisi in time course.

### ***Elettrofisiologia.***

Le caratteristiche elettrofisiologiche dei cardiomiociti in monocultura e in co-cultura con cellule C2C12 sono state investigate tramite *whole-cell patch-clamp*, come descritto in precedenza<sup>118,136</sup>. In particolare è stata valutata: (1) la presenza di ritmici potenziali d'azione; (2) le correnti di Na<sup>+</sup> in entrata, I<sub>Na</sub>; (3) correnti del Ca<sup>2+</sup> di tipo T (I<sub>Ca,T</sub>) e di tipo L (I<sub>Ca,L</sub>); (4) correnti di K<sup>+</sup> in uscita attivate dalla depolarizzazione: correnti uscenti rapide a rettificazione ritardata I<sub>Kr</sub>, correnti uscenti lente a rettificazione ritardata I<sub>Ks</sub>, e infine correnti uscenti transitorie I<sub>to</sub>; (5) la corrente con rettificazione in entrata I<sub>K1</sub>; (6) la corrente pacemaker I<sub>f</sub>. Sono state inoltre analizzate le proprietà elettrofisiologiche di gap junction tra cellule cardiache, come riportato precedentemente<sup>118</sup>.

### ***Analisi statistica.***

L'analisi statistica delle differenze tra i vari gruppi sperimentali sono state effettuate usando one-way ANOVA e il Newman-Keuls post test. I calcoli sono stati eseguiti con il GraphPad Prism 5.0 software di programmi statistici (GraphPad, San Diego, CA).

## RISULTATI FASE II

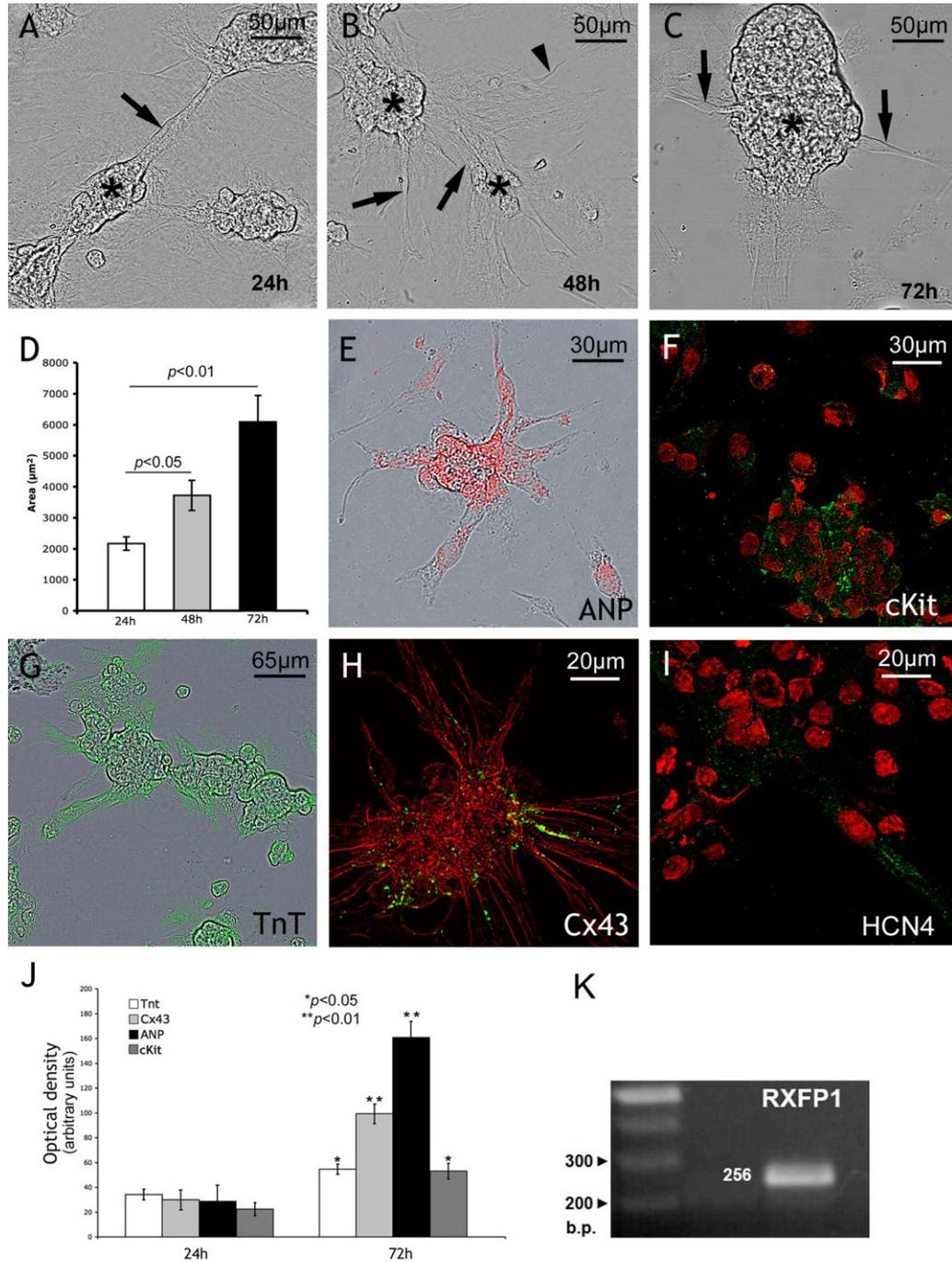
### *Caratterizzazione morfo-funzionale di cellule cardiache in monocoltura*

Le cellule cardiache sono state osservate subito dopo la piastratura e a 24, 48 e 72 ore in coltura. All'inizio apparivano di forma sferica o poliedrica senza possedere un battito spontaneo. Dopo 24h, formavano degli aggregati pulsatili che aumentavano di dimensioni man mano che andavano incontro a differenziamento (Figure 7 A-D). Queste cellule esprimevano sia i marker di staminalità ANP e cKit, sia quelli di differenziazione più tardiva cTnT, Cx43, HCN4 (un canale per il passaggio di Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> coinvolto nella ritmica depolarizzazione del miocardio, fig. 7 E-K). Questi marker erano già apprezzabili a 24 h e la loro espressione incrementava con il tempo, come dimostrato con analisi morfometrica (Fig. 7 I). Dopo 24 h di coltura erano visibili propaggini originatisi dalla periferia dei cluster. Sia l'osservazione al microscopio ottico che a quello a trasmissione evidenziava come queste strutture avessero caratteristiche altamente variabili; alcune di queste presentavano un diametro di 50-800 nm e ricordavano i nanotubi<sup>136,137</sup>, mentre altre erano composte da cellule allungate ed appiattite, *stripe-like cells*, che apparivano prive di attività contrattile spontanea (Fig. 7, 8). Quest'ultime infatti, non esprimevano il marker HCN4 ma tutti gli altri marker cardiaci, sebbene a livelli più bassi se paragonati a quelli delle cellule dei cluster agli stessi tempi di coltura (Fig. 7 E-K), supportando comunque la loro natura miocardica. L'estensione di queste propaggini aumentava progressivamente con il differenziamento, così a partire dalle 48 h in poi, tendevano a formare dei ponti che connettevano cluster vicini (Fig. 7 A-C). Abbiamo inoltre investigato se le cellule mioblastiche esprimevano recettori funzionali per l'ormone RLX; tramite RT-PCR abbiamo potuto rilevare che queste cellule esprimevano il trascritto RXFP1 (Fig. 7 J) e che l'aggiunta di RLX al mezzo di coltura causava un marcato incremento del battito (118±10 vs. 56±5 battiti/min nei controlli non stimolati).

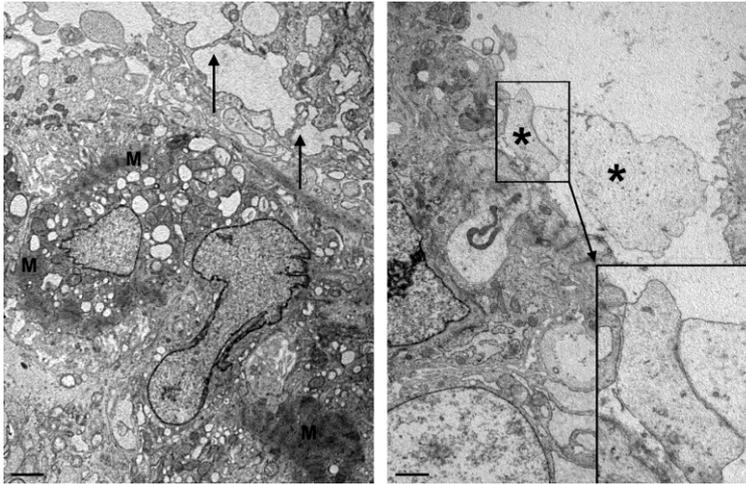
Tramite *whole-cell patch-clamp* è stato altresì dimostrato che i cardiomiociti nei cluster

risultavano funzionalmente competenti a 24 h, mostrando potenziali d'azione ritmici (AP) con una fase 4 lenta di depolarizzazione (corrente pacemaker) da -50/-48 mV. I potenziali d'azione erano caratterizzati da un rapido picco, un'inversione della polarità di membrana che raggiungeva  $15 \pm 3$  mV ( $n = 43$ ) e da un breve plateau che precedeva la ripolarizzazione (Fig. 9 A). Le durate dei potenziali d'azione quantificate a 50 e 90% della ripolarizzazione, erano  $70 \pm 5$  e  $105 \pm 12$  msec., rispettivamente. Al fine di spiegare le basi ioniche del decorso temporale del potenziale d'azione AP e la sua rapida ripolarizzazione, sono state registrate in *voltage-clamp* le correnti di membrana (Fig. 9 B,C). In particolare, i cardiomiociti mostravano: (1) correnti di  $\text{Na}^+$  in entrata,  $I_{\text{Na}}$ , nei primi 2-3 msec della pulsazione, partendo da un valore soglia di -40 mV e bloccato da TTX (Fig. 9B); (2) due correnti del  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti dal voltaggio e sensibili alla nifedipina, identificate come correnti di tipo T ( $I_{\text{Ca,T}}$ ) e di tipo L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ):  $I_{\text{Ca,T}}$  era evocata da -60 mV mentre  $I_{\text{Ca,L}}$  da -30 mV con una velocità di attivazione e inattivazione più lenta (Fig. 9C); (3) correnti di  $\text{K}^+$  tipiche di cardiomiociti adulti<sup>139</sup>, inclusa la  $I_{\text{K1}}$  a rettificazione in entrata (Fig. 10A) e la rapida  $I_{\text{to}}$  transiente in uscita (Fig. 10B; tempo al picco  $10 \pm 2$  msec. a 50 mV, bloccato da 2 mM 4-AP); (4) la corrente pacemaker  $I_{\text{f}}$  (Fig. 10C). I cardiomiociti in coltura, con il tempo, andavano incontro a maturazione, come confermato dall'incremento significativo della conduttanza massima specifica  $G_{\text{Na}}$ ,  $G_{\text{Ca,T}}$  e  $G_{\text{Ca,L}}$  (Fig. 11 A-C). Ciò era accompagnato ad un incremento dell'ampiezza di  $I_{\text{to}}$  e  $I_{\text{f}}$  (Fig. 11 D,E) e nella dimensione e voltaggio dipendenza di  $I_{\text{K1}}$  (Fig. 11 F) a 72 h. D'altro canto, le *stripe-like cells* mostravano un fenotipo elettrico aspecifico: in particolare, non sono stati mai registrati potenziali d'azione spontanei o evocati ed erano assenti  $I_{\text{Na}}$ ,  $I_{\text{to}}$  e  $I_{\text{K1}}$ .  $I_{\text{Ca,T}}$  e  $I_{\text{Ca,L}}$  erano caratterizzate da ampiezza più piccola rispetto a quelle registrate nei cardiomiociti ai medesimi tempi sperimentali. È stato interessante notare che in circa il 7-10% delle *stripe-like cells*, le correnti tipiche dei cardiomiociti erano registrabili a tempi più tardivi:  $I_{\text{to}}$  appariva a 48 h ed aumentava inoltre a 72 h mentre  $I_{\text{K1}}$  era registrabile a 72 h (Fig. 11) rispetto a quelle dei cluster. Tutte le suddette osservazioni, considerate nel complesso, suggeriscono che le monoculture di cellule cardiache neonatali comprendevano sia cellule muscolari progenitrici, capaci di proliferare e differenziare in cardiomiociti adulti e

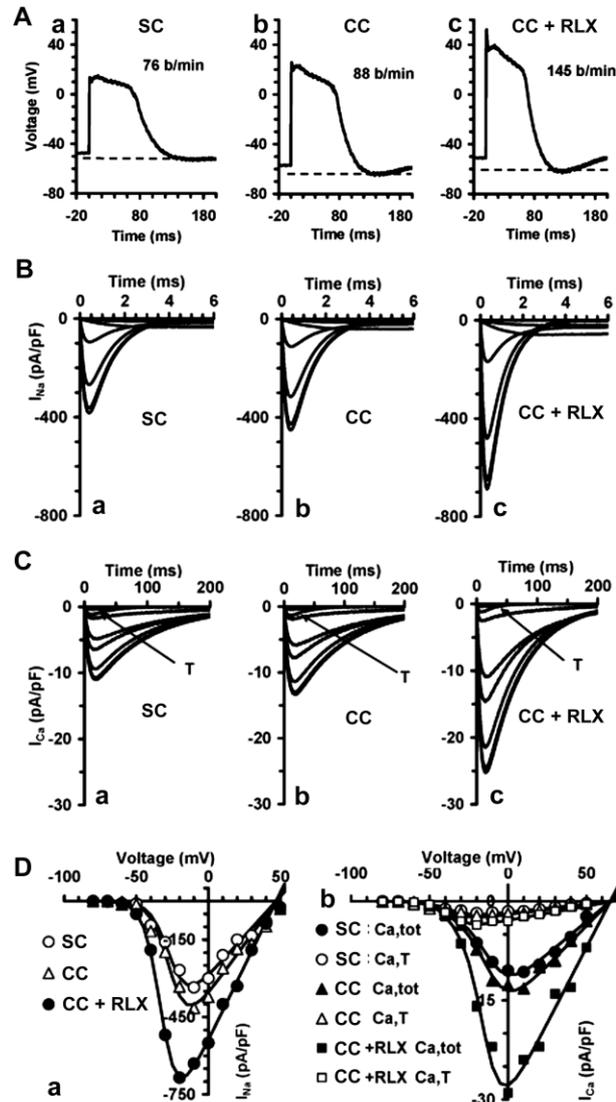
provviste di particolari strutture di connessione come nanotubi e sia *stripe-like cells* capaci di connettere aggregati di cardiomiociti adiacenti.



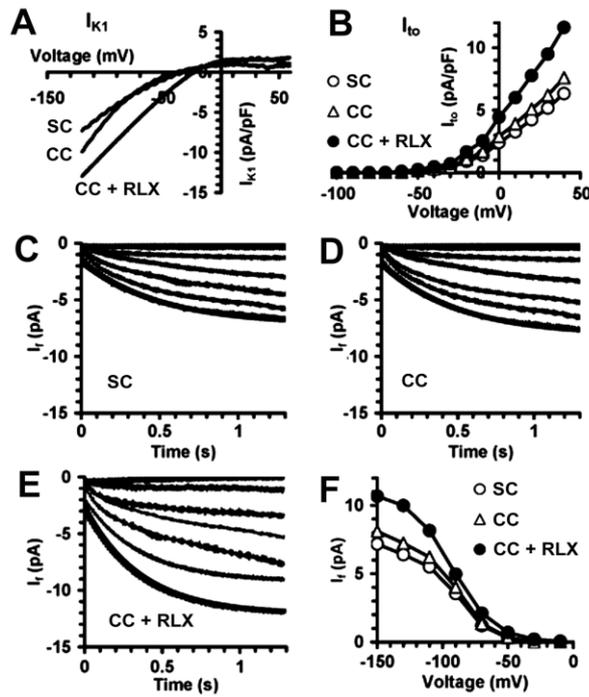
**Fig. 7.** Caratterizzazione di cellule muscolari cardiache di topo neonato in monocultura a differenti tempi. Immagini a contrasto di interferenza differenziale (DIC) mostrano cluster di cardiomiociti (asterischi), *stripe-like cells* (freccie), e nanotubi (teste di freccia) che si originano dalla periferia del cluster (A-C). Morfometria dell'area superficiale dei cluster (D). L'immunofluorescenza confocale evidenzia l'espressione di marker tipici del muscolo cardiaco, precoci (ANP e cKit) e tardivi (cTnT e Cx43) a 24 ore di coltura (E-I). Analisi morfometrica dei marker a 24 e 72 h di coltura (J). RT-PCR mostra l'espressione di mRNA per il recettore RXFP1 della RLX e per la  $\beta$ -actina, assunta come gene di riferimento (K). Le immagini sono rappresentative di almeno 3 esperimenti indipendenti. Barre = 10  $\mu$ m.



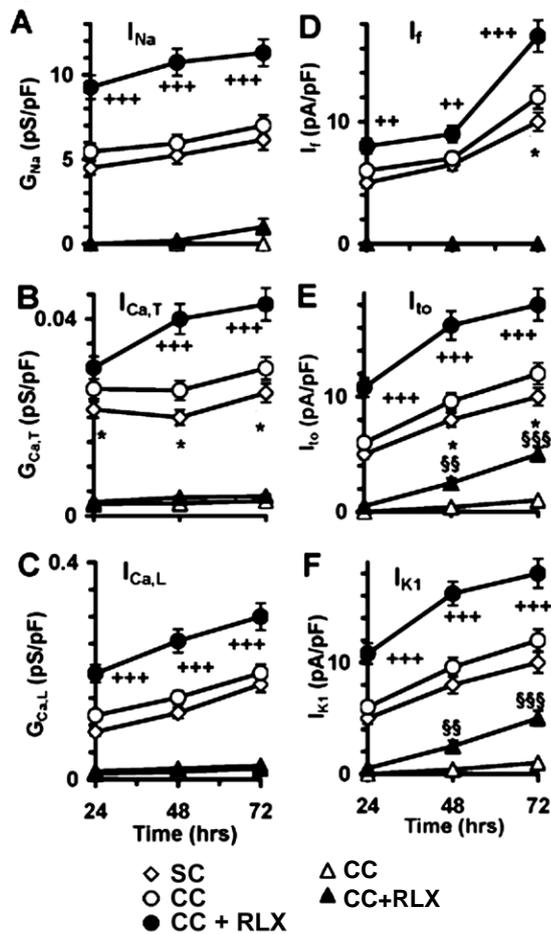
**Fig.8.** Caratteristiche ultrastrutturali di cardiomiociti a 72 h di coltura. Le cellule mostrano enorme citoplasma contenente numerosi organelli inclusi mitocondri a forma di bastoncino, reticolo endoplasmatico e miofibrille sparse. Nanotubi (pannello di sinistra; frecce) e *stripe-like cells* (pannello a destra; asterischi), appaiono strettamente apposti alla membrana plasmatica dei cardiomiociti, connettono cellule adiacenti. Barre = 10  $\mu\text{m}$ .



**Fig.9.** Caratteristiche elettrofisiologiche di cardiomiociti in monocoltura (SC, pannello di sinistra) ed in co-coltura con C2C12/GFP (CC, pannello centrale) o C2C12/RLX (CC + RLX, pannello di destra). A (a-c): potenziali d'azione rappresentativi registrati in cardiomiociti battenti tramite patch clamp (b/min = battiti/min). B (a-c): tracce di corrente  $I_{\text{Na}}$ . C (a-c): tracce di corrente  $I_{\text{Ca}}$  ( $T = I_{\text{Ca}}$  transiente di tipo T). D: Funzioni di Boltzmann che riproducono le curve I-V per il picco di corrente della  $I_{\text{Na}}$  (a), per la corrente totale del calcio  $I_{\text{Ca,tot}}$  (b, simboli vuoti) e correnti di  $\text{Ca}^{2+}$  di tipo T (b, simboli pieni), registrate in presenza di nifedipina.



**Fig. 10.** Correnti transienti a rettificazione in ingresso,  $I_{K1}$  (A), in uscita,  $I_{to}$  (B), e 'funny current'  $I_f$  (C-F) registrate in cardiomiociti in monocultura (S,C) e in cocoltura con C2C12/GFP (C,C) o C2C12/RLX (C,C + RLX) a 24 h. RLX aumenta l'ampiezza di  $I_{K1}$  spostando la sua voltaggio dipendenza verso potenziali più positivi e aumenta la voltaggio dipendenza di  $I_{to}$  e  $I_f$  (incrementa l'ampiezza di  $I_{K1}$  spostando la sua voltaggio dipendenza verso potenziali più positivi).

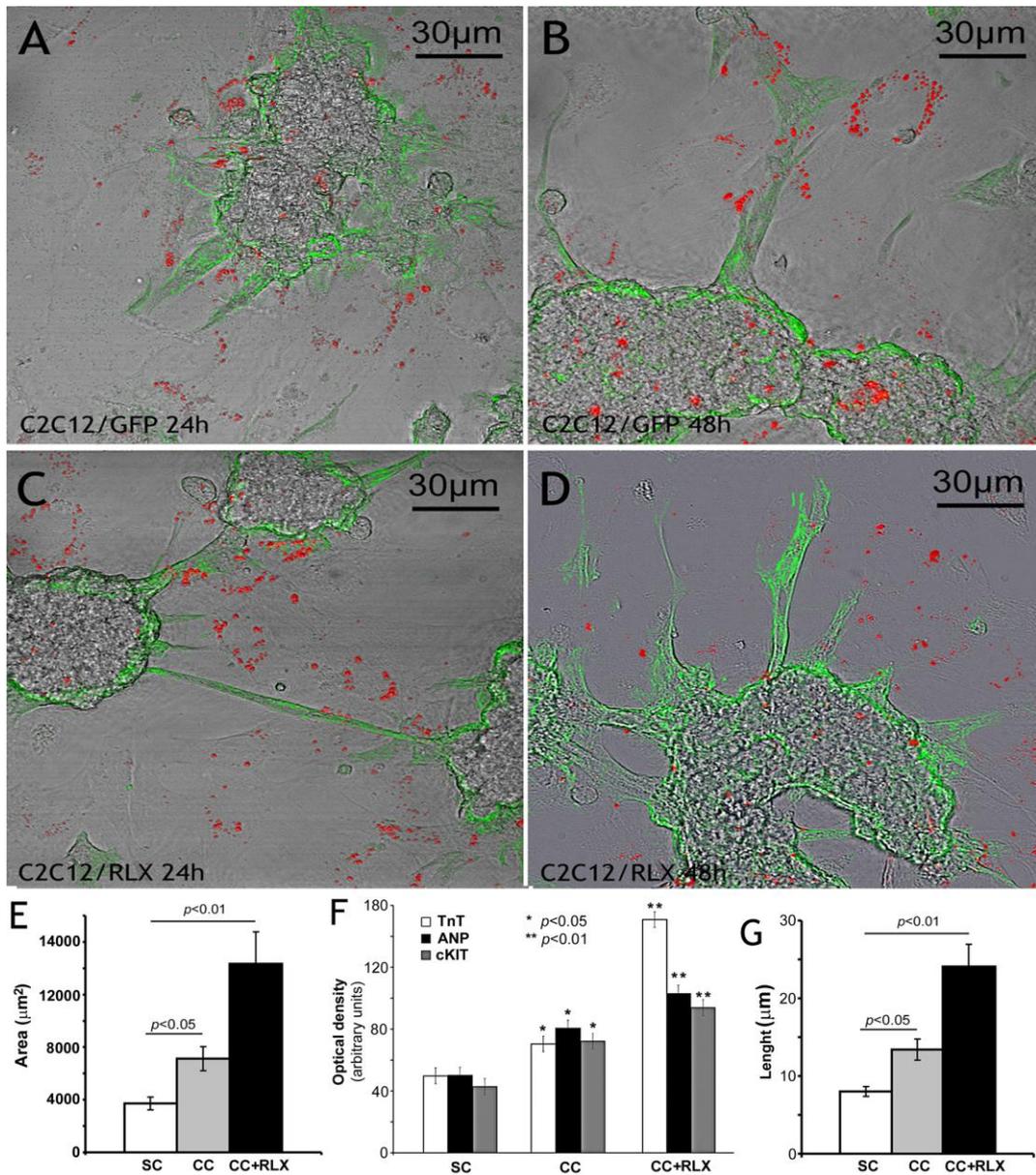


**Fig. 11.** Conduttanza dei canali al  $Na^+$  (A), al  $Ca^{2+}$  di tipo T (B) e al  $Ca^{2+}$  di tipo L (C) e intensità delle correnti  $I_f$  (D),  $I_{to}$  (E) e  $I_{K1}$  (F) registrate nei cardiomiociti (cerchi) e nelle *stripe-like cells* (triangoli) in monocultura (S,C) e in co-coltura con C2C12/GFP (C,C) o C2C12/RLX (C,C + RLX) a differenti tempi. La maggior parte dei parametri considerati sono incrementati in presenza di RLX. \* $p < 0.05$

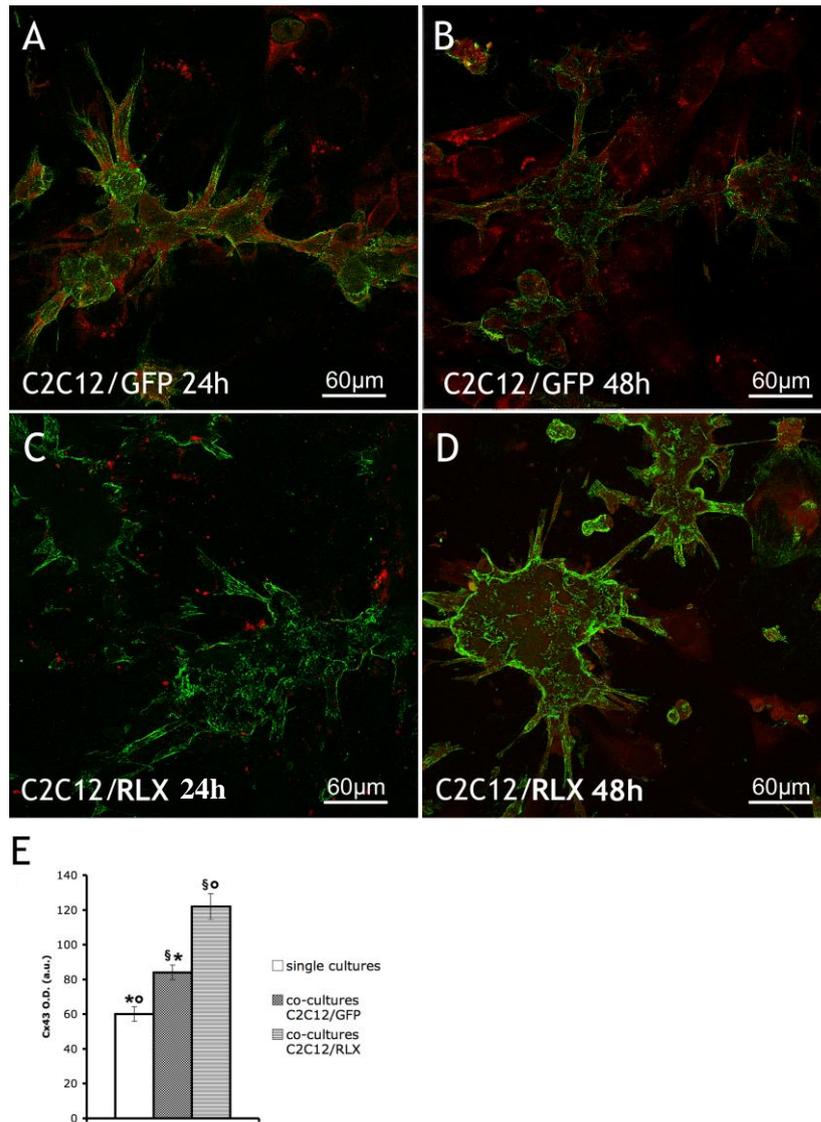
### ***Caratterizzazione morfo-funzionale di cellule cardiache in presenza di mioblasti C2C12 e RLX***

Negli esperimenti eseguiti in co-coltura, i mioblasti C2C12 potevano essere facilmente identificabili e distinguibili per la presenza di numerosi nanocristalli fluorescenti rossi nel loro citoplasma ed apparivano come cellule appiattite senza alcuna tendenza a formare miotubi né ad esprimere marker cardiaci (Fig. 12 A-D). I mioblasti si localizzavano attorno agli aggregati cardiomiocitari nonché vicino alle *stripe-like cells*, quasi a suggerire una sorta di supporto meccanico in grado di guidare l'allungamento di queste strutture. La presenza dei mioblasti scheletrici in coltura era correlata ad una evidente stimolazione della proliferazione e del differenziamento delle cellule cardiache costituenti i cluster, come evidenziato dall'incremento della dimensione degli aggregati (Fig. 12 E) e da un'aumentata espressione dei marker cardiaci rispetto alle monoculture (Fig. 12 A-D, F). Inoltre la lunghezza delle strutture di connessione (*stripe-like cells* e nanotubi) che formavano dei ponti in grado di connettere aggregati battenti adiacenti, aumentava significativamente nelle co-culture rispetto alle monoculture (Fig. 12 G). Questo fenomeno risultava maggiormente evidente qualora in co-coltura fossero utilizzate C2C12/RLX. In modo interessante, in co-coltura, la Cx43 era localizzata non solo all'interno dei cluster a connettere singoli cardiomiociti, ma anche nelle zone di contatto tra queste cellule e le *stripe-like cells*, infine tra quest'ultime e i mioblasti attorno, quasi a suggerire un complesso accoppiamento cellulare tra i differenti tipi cellulari in co-coltura (Fig. 13 A-D). Da notare come in queste condizioni sperimentali, l'espressione della Cx43 aumentava rispetto alle mono-culture, specialmente in co-culture con C2C12/RLX (Fig. 13 E). In accordo con i dati morfologici, l'analisi elettrofisiologica mostrava che le correnti associate a canali voltaggio-dipendenti ( $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,T}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_f$ ) erano caratterizzate da ampiezza maggiore nei cardiomiociti in co-coltura rispetto a quelli in monocultura (Fig.11). Nelle *stripe-like cells* cellulari si assisteva a ad una espressione tempo-dipendente di alcuni specifici canali cardiaci, specialmente in presenza di C2C12. Infatti,  $I_{K1}$  compariva a 48 h aumentando alle 72 h, e  $I_{to}$  incrementava progressivamente in co-coltura, raggiungendo valori più alti in presenza

di C2C12/RLX (Fig. 11 E,F). La corrente  $I_f$  risultava non rilevabile in queste strutture, in tutte le condizioni sperimentali sopracitate (Fig. 11 D). Le proprietà elettriche dei nanotubi non potevano essere studiate a causa di ovvi limiti tecnici.



**Fig. 12.** Caratterizzazione morfologica ed immunofenotipica dei cardiomiociti in co-cultura con mioblasti C2C12/GFP e C2C12/RLX. Immagini in DIC e in fluorescenza confocale sovrapposte mostrano l'espressione di cTnT ai tempi indicati (A-D); le cellule C2C12 sono marcate con nanocristalli fluorescenti rossi. Valutazione morfometrica dell'area superficiale dei cluster di cardiomiociti (E), dell'espressione dei marker immunofenotipici indicati (F) e della lunghezza complessiva delle *striae-like cells* e nanotubi (G), considerati a 48 h di cultura. Le immagini sono rappresentative di almeno 3 esperimenti indipendenti. Barre = 5  $\mu\text{m}$ .

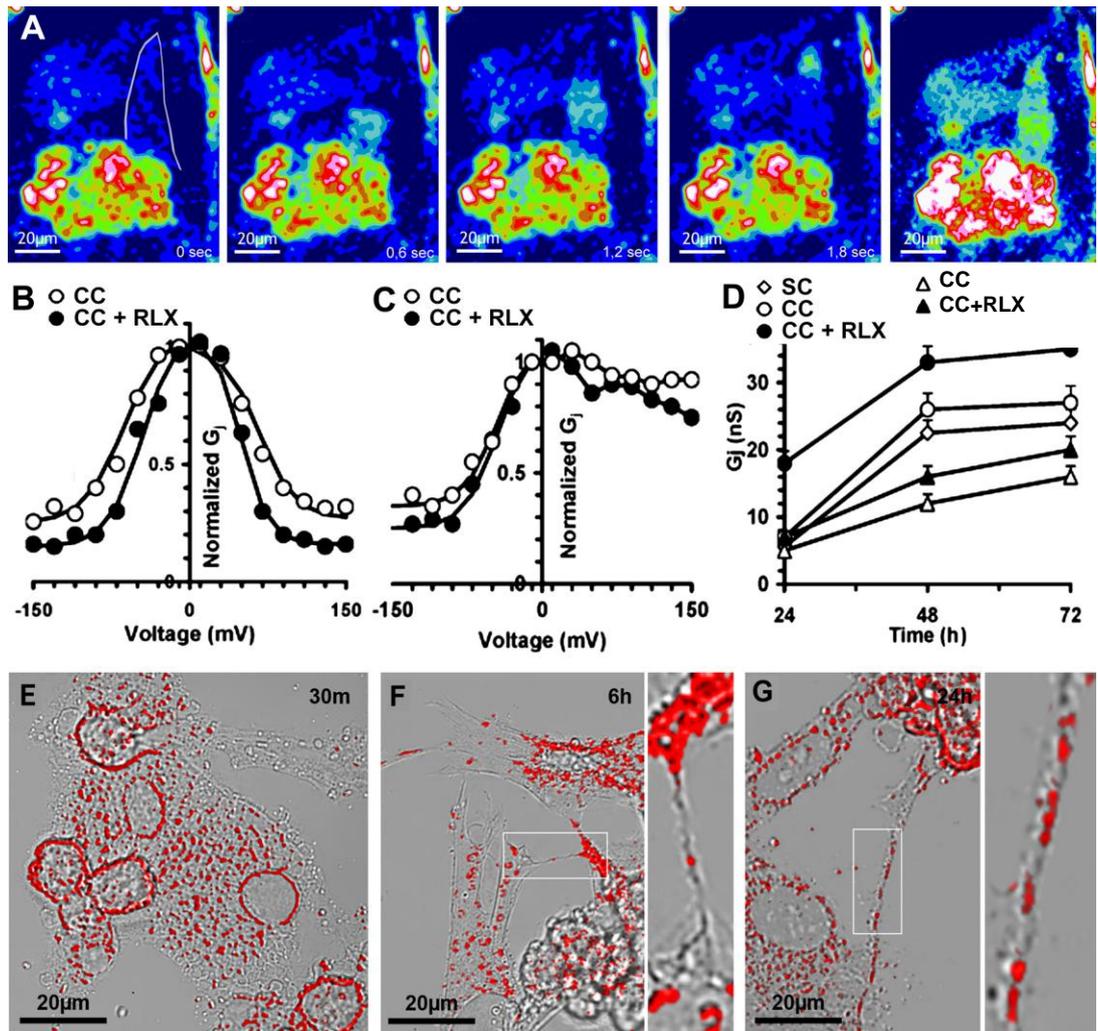


**Fig. 13.** Caratterizzazione morfologica ed immunofenotipica dei cardiomiociti in co-cultura con mioblasti C2C12/GFP e C2C12/RLX. Immagini in DIC e di fluorescenza confocale sovrapposte mostrano l'espressione di cTnT ai tempi indicati (A-D); le cellule C2C12 sono marcate con nanocristalli fluorescenti rossi. Valutazione morfometrica dell'area superficiale dei cluster di cardiomiociti (E), dell'espressione dei marker immunofenotipici indicati (F) e della lunghezza complessiva delle *strpe-like cells* e nanotubi (G), considerati a 48 h di cultura. Le immagini sono rappresentative di almeno 3 esperimenti indipendenti. Barre = 5 μm.

### *Accoppiamento intercellulare*

Al fine di determinare la presenza di accoppiamento funzionale intercellulare, monoculture e co-culture sono state caricate con Fluo3 e le variazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  registrate al microscopio confocale in time course. Ritmiche oscillazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  si propagavano dai cardiomiociti a livello dei cluster alle *stripe-like cells* e ai nanotubi (Fig. 13 A). Nelle co-culture, i transienti di  $\text{Ca}^{2+}$  cardiaci raggiungevano addirittura i mioblasti C2C12 adiacenti, indicando accoppiamento cellulare eterologo, che principalmente si attuava attraverso canali di tipo gap esprimenti Cx43 (dati non mostrati). L'analisi elettrofisiologica dimostrava la presenza di tipiche correnti trans-giunzionali ( $I_j$ ) tra cardiomiociti e *stripe-like cells* adiacenti, evocate da un protocollo di stimolazione ad impulsi bipolari. Basandosi sull'equazione di Boltzmann per le correnti registrate, abbiamo trovato che la maggior parte degli accoppiamenti cardiomiocita-cardiomiocita mostravano una dipendenza dal voltaggio simmetrica (Fig. 13 B; 70% e 80% rispettivamente) tipica della Cx43. Al contrario, la maggior parte delle coppie cardiomiocita-*stripe-like cell* (80%) mostrava una voltaggio-dipendenza asimmetrica dei valori di conduttanza delle gap junction  $G_j$  (Figure 13 C), suggerendo la presenza di gap junction eteromeriche, eterotipiche. Da notare come l'andamento asimmetrico della voltaggio-dipendenza di  $G_j$  ed i suoi valori massimi aumentavano con il tempo in co-cultura, specialmente in presenza di C2C12/RLX (Fig. 13 D), rafforzando così il ruolo di mioblasti e RLX nel facilitare la comunicazione tra cellule cardiache tramite gap junction<sup>118</sup>. Come supposto, l'aggiunta di eptanolo (1 mM), noto bloccante delle gap junction, inibiva completamente  $G_j$  tra i cardiomiociti e le *stripe-like cells* (dati non

mostrati). L'incremento delle comunicazioni intercellulari di tipo gap in co-cultura, specialmente in presenza di RLX, ben si correlava all'aumento della frequenza di battito dei cardiomiociti in queste condizioni sperimentali. Da notare come tale frequenza aumentava anche nel caso di aggiunta esogena di RLX ( $10^{-9}$  M) alle co-culture con C2C12/GFP mentre il blocco della RLX endogena attuato tramite l'aggiunta di anticorpi alle co-culture con C2C12/RLX, risultava in una diminuzione significativa della frequenza di battito (dati non mostrati). Da sottolineare che anche i nanotubi permettono il trasporto intercellulare di organelli. Infatti, 30 min dopo la marcatura con Mito-Tracker, i nanotubi risultavano privi di mitocondri, mitocondri che invece aumentavano con il passare del tempo (6 e 24 h) (Fig. 13 E-F-H).



**Fig. 14.** Flussi di  $\text{Ca}^{2+}$  tra cellule cardiache (A). Le colture cellulari sono state caricate con l'indicatore fluorescente del  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo.3 e registrate al microscopio confocale in time course. Analisi elettrofisiologica dell'accoppiamento cellulare tramite gap junction registrato nei cardiomiociti (cerchi) e nelle *stripe-like cells* (triangoli) in co-culture con C2C12/GFP (CC) o C2C12/RLX (CC+RLX) a 24-h. (B,C,D) Il grafico  $G_j$  vs  $V_j$  conduttanze delle gap junction normalizzate mostra un andamento simmetrico nelle coppie cardiomiocita-cardiomiocita (B) e un andamento asimmetrico nelle coppie cardiomiocita-*stripe-like cells* (C) nelle stesse condizioni sperimentali. Da notare come i valori di  $G_j$  risultavano significativamente più piccoli negli accoppiamenti cellulari eterologhi rispetto agli omologhi. Questi tendono ad aumentare con il tempo, specialmente in presenza di RLX (D). Trasferimento di mitocondri (rossi) attraverso nanotubi, esaminato tramite il saggio del Mito-Tracker ai tempi indicati (E,F,G). Dettagli di nanotubi sono mostrati nei riquadri.

## DISCUSSIONE FASE II

Studi recenti in modelli animali e in trial clinici, hanno fornito evidenze sperimentali che nel cuore adulto sono presenti cellule progenitrici muscolari, anche nel miocardio vitale attorno all'area infartuata<sup>124,133,140,141</sup>, ponendo quindi grandi aspettative per il trattamento delle patologie cardiache post-ischemiche<sup>121,122,123</sup>. Tuttavia la principale funzione di queste cellule staminali sembra essere la sostituzione dei cardiomiociti invecchiati o danneggiati piuttosto che la ricostituzione di vaste aree di miocardio danneggiato, come accade in seguito ad un'occlusione dell'arteria coronaria. Dunque, il potenziale rigenerativo intrinseco delle cellule staminali cardiache è considerato di limitata applicazione clinica al fine di ripristinare miocardio funzionale in seguito a scompenso cardiaco<sup>142</sup>. Sulle base di queste premesse, le strategie terapeutiche atte a potenziare la proliferazione e il differenziamento di queste cellule, potrebbero offrire nuove opportunità terapeutiche ed avere importanti implicazioni cliniche nel trattamento di queste patologie. Detto ciò, il presente studio conferma la presenza di un *pool* di cellule indifferenziate presenti nel cuore di topo il cui differenziamento può essere positivamente influenzato da mioblasti scheletrici, che potrebbero comportarsi come cellule stromali di supporto, e dall'ormone cardiotropico RLX. Infatti, i cardiomiociti in co-cultura mostrano un'efficiente potenziale di conversione verso un fenotipo cardiaco maturo, come provato dalle loro caratteristiche immunofenotipiche ed elettrofisiologiche. Da notare come il differenziamento di queste cellule si accompagni ad un'espansione della rete di connessione intercellulare composta sia da sottili

nanotubi che da *stripe-like cells* più larghe, entrambe adibite alla connessione di cardiomiociti di cluster adiacenti. Le strutture nanotubulari sono state di recente descritte *in vitro*, in colture di cellule in corso di differenziamento, dove è stato supposto potrebbero rappresentare un nuovo meccanismo di comunicazione intercellulare, capace di scambio di componenti citoplasmatici tra cellule accoppiate<sup>135,137,138</sup>. In maniera interessante, i nanotubi sono stati descritti in colture cellulari cardiache e supposto essere coinvolti nella formazione di un sincizio funzionale<sup>135,143</sup>. L'osservazione della presenza di *stripe-like cells* in grado di collegare cardiomiociti di cluster adiacenti, è del tutto insolita. Dal momento che esprimono marker cardiaci, sebbene a bassi livelli, ma mancano di proprietà elettriche tipiche delle cellule eccitabili, queste strutture potrebbero rappresentare cellule miocardiche indifferenziate che non terminano il differenziamento verso cellule contrattili, almeno nelle nostre condizioni sperimentali. Da notare comunque che queste cellule risultano accoppiate con i cardiomiociti dei cluster attraverso canali funzionali di tipo gap, come conferma la propagazione di transienti di  $Ca^{2+}$  e correnti ioniche tra cardiomiociti battenti. Queste caratteristiche peculiari fortemente suggeriscono che le *stripe-like cells* potrebbero rappresentare vie addizionali per lo scambio intercellulare, scambio necessario per la regolazione e la coordinazione del differenziamento cardiomiocitario. Questa visione si trova in linea con altre osservazioni riguardanti il ruolo del  $Ca^{2+}$  nel differenziamento miocardico<sup>144</sup>. Certamente non è possibile predire il destino di questi sistemi di comunicazione una volta che il miocardio abbia raggiunto la differenziazione terminale. Si potrebbe però ipotizzare che queste vie di comunicazioni intercellulari, si

stabiliscano transientemente per poi, aumentata la densità cardiomiocitaria, sparire i nanotubi mentre le propaggini cellulari seguire due distinti destini: o differenziare in cardiomiociti od andare incontro ad apoptosi. Dal momento che i mioblasti non differenziano in elementi contrattili maturi (né verso un fenotipo scheletrico e nemmeno verso un fenotipo cardiaco) ma invece formano una rete intorno alle cellule cardiache, ciò fa supporre che la presenza dei mioblasti potrebbe favorire il differenziamento cardiaco attraverso la formazione di una sorta d'impalcatura capace di guidare e coordinare i sistemi di comunicazione intercellulare, favorendo il differenziamento del tessuto miocardico. Questo punto di vista ben si accoppia con il concetto che le cellule progenitrici cardiache sono influenzate nella loro crescita e differenziamento dalle cellule di supporto, di origine differente ma che colonizzano lo stesso microambiente e creano una nicchia cardiogenica<sup>140,145,146</sup>. E' stato infatti recentemente dimostrato che le cellule di supporto stromali del cuore esprimono il ligando Jagged1 per Notch, il quale, attivato dal segnale di Notch, può promuovere il differenziamento delle cellule progenitrici cardiache verso il fenotipo maturo<sup>146</sup>. E' altresì possibile che i mioblasti possano contribuire al differenziamento cardiaco attraverso altri meccanismi che coinvolgono accoppiamento intercellulare eterologo tra due tipi cellulari. In verità, in accordo con nostri studi precedenti<sup>118</sup>, abbiamo osservato che la Cx43 è localizzata nei punti di contatto tra mioblasti e cellule cardiache e studi recenti hanno sottolineato l'importanza dell'accoppiamento eterocellulare con cellule non eccitabili, come quelle stromali, per la regolazione della funzionalità cellulare cardiaca<sup>147</sup>. Perciò si potrebbe supporre che i mioblasti C2C12 possano trasferire segnali pro-differenzianti ai

cardiomiociti adiacenti. La presenza di RLX infine, rilasciata in modo costante dai mioblasti C2C12/RLX, agisce sinergicamente con le cellule C2C12, potenziando i sistemi di comunicazione intercellulare e il potenziale di differenziazione dei cardiomiociti. L'osservazione che le cellule cardiache possiedono il recettore RXFP1 e rispondono alla RLX aumentando la frequenza dei battiti, in accordo con i riportati effetti cronotropi di questo ormone<sup>148</sup>, spiega un'azione specifica e diretta della RLX su queste cellule. Questi dati suggeriscono che la RLX, accanto alle sue note azioni cardiotropiche<sup>127,129,130,131</sup>, può anche essere concepita come un modulatore cardiaco fisiologico. In conclusione, i dati ottenuti da questo studio, possono contribuire a spiegare il meccanismo alla base del miglioramento del cuore post-infartuato in seguito a trapianto cellulare, supportando il concetto emergente che le cellule inoculate possono influenzare il reclutamento locale di cellule staminali cardiache. Infine, questo studio suggerisce che le cellule inoculate possono essere dei vettori idonei per il rilascio locale di molecole cardiotropiche, come la RLX, ampliando ulteriormente il potenziale terapeutico della cardiomioplastica cellulare per il ripristino della funzionalità cardiaca.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dargie HJ, McMurray J. Chronic heart failure: epidemiology, aetiology, pathophysiology and treatment. In: Rowlands DJ, ed. Recent advances in cardiology II. London: Churchill Livingstone.
2. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report. *J Heart Lung Transplant.* 1999
3. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, et al. Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 2001
4. Thompson JG. Atheroma in a transplanted heart. *Lancet.* 1969
5. El Oakley RM, Yonan NA, Simpson BM, Deiraniya AK. Extended criteria for cardiac allograft donors: a consensus study. *J Heart Lung Transplant.* 1996
6. Soonpaa MH, Daud AI, Koh GY, et al. Potential approaches for myocardial regeneration. *Ann NY Acad Sci.* 1995
7. El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A, Yacoub MH. Myocyte transplantation for myocardial repair: a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 2001
8. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* 2000
9. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med.* 2000
10. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001.
11. The human embryonic stem cell and the human embryonic germ cell. In: Stem cells: scientific progress and future research directions. <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.html>
12. Jones JM, Thompson JA. Human embryonic stem cell technology. *Semin Reprod Med.* 2000
13. Pedersen RA. Embryonic stem cells for medicine. *Sci Am.* 1999
14. Li RK, Mickle DAG, Weisel RD, Zhang J, Mohabeer MR. In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes. *Circ Res.* 1996
15. Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest.* 1993
16. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg.* 1996
17. Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, et al. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation.* 1997
18. Li RK, Mickle DAG, Weisel RD, et al. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. *Circulation.* 1997
19. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2000
20. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2000
21. Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 1995
22. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998
23. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation.* 1999
24. Atkins BZ, Lewis CW, Kraus WE, Hutcheson KA, Glower DD, Taylor DA. Intracardiac

- transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ. *Ann Thorac Surg.* 1999
25. Sakai T, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg.* 1999
  26. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Li G, Yau TM. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg.* 2000
  27. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation.* 2000
  28. Li RK, Weisel RD, Mickle DA, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000
  29. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001
  30. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001
  31. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001
  32. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RCJ. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001
  33. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 2002
  34. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002
  35. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 2001
  36. Can stem cells repair a damaged heart? In: *Stem cells: scientific progress and future research directions.* <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.html>
  37. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998
  38. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997
  39. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999
  40. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001
  41. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001
  42. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2000
  43. Korbting M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med.* 2002
  44. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000
  45. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999
  46. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001
  47. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002
  48. Konieczny SF, Emerson CP Jr. 5-azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell.* 1984

49. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999
50. Zibaitis A, Greentree D, Ma F, Marelli D, Duong M, Chiu R. Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Transplant Proc*. 1994
51. Murry CE, Kay MA, Bartosek T, Hauschka SD, Schwartz SM. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest*. 1996
52. Goldspink G, Scutt A, Loughna PT, Wells DJ, Jaenicke T, Gerlach GF. Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am J Physiol*. 1992
53. Severs NJ. Microscopy of the gap junction: a historical perspective. *Microsc Res Tech*. 1995
54. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol*. 2000
55. Garcia J, Tanabe T, Beam KG. Relationship of calcium transients to calcium currents and charge movements in myotubes expressing skeletal and cardiac dihydropyridine receptors. *J Gen Physiol*. 1994
56. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DAG. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol*. 1999
57. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001
58. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, et al. Smooth muscle cells transplantation is better than heart cells transplantation for improvement of heart function in dilated cardiomyopathy. *Yonsei Med J*. 2002
59. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med*. 2002
60. Fedak P, Verma S, Weisel RD, Mickle DAG, Li RK. Angiogenesis: protein, gene or cell therapy? *Heart Surg Forum*. 2001
61. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DAG, Choi A, Yau FM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 1999
62. Bonafè F, Muscari C, guarnieri C, Cardarera CM. Regeneration of infarcted cardiac tissue: the route of stem cells. *Ital Heart J Suppl*. 2003
63. Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol*. 1991
64. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990
65. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res*. 1996
66. Hunt SA. Current status of cardiac transplantation. *JAMA*. 1998
67. Soonpaa MH, Daud AI, Koh GY, et al. Potential approaches for myocardial regeneration. *Ann NY Acad Sci*. 1995
68. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*. 2002
69. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*. 1995
70. Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev*. 1995
71. Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest*. 1998
72. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol*. 1994
73. Wobus AM. Potential of embryonic stem cells. *Mol Aspects Med*. 2001

74. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, et al. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1997
75. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006
76. Rubart R, Field LJ. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol.* 2006
77. Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, Rochwalsky U, Seeger F, Honold J, Hoffmann J, Urbich C, Lehmann R, Arenzana-Seisdesdos F, Aicher A, Heeschen C, Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2005
78. Ye L, Haider HK, Sim EK. Adult stem cells for cardiac repair: choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp Biol Med.* 2006
79. Hristov M, Heussen N, Schober A, Weber C. Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J Cell Mol Med.* 2006
80. Leobon B, Garcin I, Menaschè P, Vilquin J-T, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003
81. Caplice NM. The future of cell therapy for acute myocardial infarction. *Nature.* 2006
82. Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhan L, Morello F, Mu H, Melo L, Pratt RE, Inwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006
83. Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006
84. Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME, Amento EP. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts *in vitro* and inhibits lung fibrosis in a murine model *in vitro*. *J Clin Invest.* 1996
85. Bani D, Bigazzi M. Clinical aspects and therapeutic perspectives of relaxin. *Curr Med Chem-Immunol Endocr Metab Agents.* 2005
86. Conrad KP, Novak J. Emerging role of relaxin in renal and cardiovascular function. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2004
87. Perna AM, Masini E, Nistri S, Briganti V, Chiappini L, Stefano P, Bigazzi M, Pieroni C, Bani Sacchi T, Bani D. Novel drug development opportunity for relaxin in acute myocardial infarction: evidences from a swine model. *FASEB J.* 2005
88. Wang QD, Sjöquist PO. Myocardial regeneration with stem cells: pharmacological possibilities for efficacy enhancement. *Pharmacol Res.* 2006
89. Smits PC, van Geun RJ, Poldermans D, Bountiokos M, Onderwater EE, Lee CH, Maat AP, Serruys PW. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003
90. Suzuki K, Murtuza B, Fukushima S, Smolenski RT, Varela-Carver A, Coppen SR, Yacoub MH. targeted cell delivery into infarcted rat hearts by retrograde intracoronary infusion: distribution, dynamics, and influence on cardiac function. *Circulation.* 2004
91. Silvertown JD, Ng J, Sato T, Summerlee AJ, Medin JA. H2 relaxin overexpression increases *in vivo* prostate xenograft tumor growth and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2006
92. Jegger D, Jeanrenaud X, Nasratullah M, Chassot PG, Mallik A, Tevaearai H, von Segesser LK, Segers P, Stergiopoulos N. Noninvasive doppler derived myocardial performance index in rats with myocardial infarction: validation and correlation by conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006
93. Tei C, Ling LH, Hodge DO. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function: a study in normals and dilated cardiomyopathy. *J Cardiol.* 1995
94. Vandervelde S, van Luyn MJA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2005
95. Kato M, Dote K, Sasaki S, Goto K, Takemoto H, Habara S, Hasegawa D, Myocardial

- performances index for assessment of left ventricular outcome in successfully recanalised anterior myocardial infarction. *Heart*. 2005
96. Uemurra R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006
  97. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002
  98. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001
  99. Samuel CS, Du XJ, Bathgate RA, Summers RJ. 'Relaxin' the stiffened heart and arteries: the therapeutic potential for relaxin in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2006
  100. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuki M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Eashira K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2003
  101. Unemori EN, Lewis M, Constant J, Arnold G, Grove BH, Normand J, Deshpande U, Salles A, Pickford LB, Erikson ME, Hunt TK, Huang X. Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively at wound sites. *Wound Repair Regen*. 2000
  102. Hewitson TD, Mookerjee I, Masterson R, Zhao C, Tregear GW, Becker GJ, Samuel CS. Endogenous relaxin is a naturally occurring modulator of experimental renal tubulo interstitial fibrosis. *Endocrinology*. 2007
  103. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res*. 2006
  104. Hughes SM, Blau HM. Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature*. 1990
  105. Wainwright CL. Matrix metalloproteinases, oxidative stress and the acute response to acute myocardial ischaemia and reperfusion. *Curr Opin Pharmacol*. 2004
  106. Morita H, Khanal S, Rastogi S, Suzuki G, Imai M, Todor A, Sharov VJ, Goldstein S, Neill TP, Sabbah HN. Selective matrix metalloproteinase inhibition attenuates progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006
  107. Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, Hayashi T, Inamoto S, Koh KR, Ohta K, Izumi Y, Nakamura Y, Akioka K, Kitaura Y, Takeuchi K, Yoshikawa J. Vascular endothelial growth factor-expression mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2005
  108. Wang Y, Haider HK, Ahmad N, Xu M, Ge R, Ashraf M. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2006
  109. Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*. 2005
  110. Molkenin JD, and Dorn GW. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. 2001
  111. Anversa P. and Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res*. 1998
  112. Kajstura J. et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998
  113. Beltrami AP et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001
  114. Ellison MG., Torella D., Karakikes I., Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007
  115. Torella D. et al. Exercise activates cardiac stem/progenitor cells through the induction of growth factor production by the myocardium (abstract). *Eur Heart J*. 2007

- 116 Ellison MG et al. Myocardial damage induces a growth factor para/autocrine loop in the spared myocytes which fosters cardiac stem cell activation and ensuing myocyte regeneration (abstract). *Circulation*. 2006
- 117 Torella D., Eleison GM., Karakises I., Nadal-Ginard B. Growth-factor-mediated cardiac stem cell activation in myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007
118. Formigli L, Francini F, Tani A, Squecco R, Nosi D, Polidori L, Nistri S, Chiappini L, Cesati V, Pacini A, Perna AM, Orlandini GE, Zecchi-Orlandini S, Bani D. Morphofunctional integration between skeletal myoblasts and adult cardiomyocytes in coculture is favored by direct cell-cell contacts and relaxin treatment. *Am J Physiol (Cell Physiol)*. 2005
119. Formigli L, Perna AM, Meacci E, Cinci L, Margheri M, Nistri S, Tani A, Silvertown J, Orlandini G, Porciani C, Zecchi-Orlandini S, Medin J, Bani D. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodeling. *J Cell Mol Med*. 2007
120. Caplice NM. The future of cell therapy for acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006
121. Müller P, Beltrami AP, Cesselli D, Pfeiffer P, Kazakov A, Böhm M. Myocardial regeneration by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2005
122. Torella D, Ellison GM, Méndez-Ferrer S, Ibanez B, Nadal-Ginard B. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006
123. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007
124. Rota M, Hosoda T, De Angelis A, Arcarese ML, Esposito G, Rizzi R, Tillmanns J, Tugal D, Musso E, Rimoldi O, Bearzi C, Urbanek K, Anversa P, Leri A, Kajstura J. The young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function. *Circ Res*. 2007
125. Dschietzig T, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G, Stangl K. The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J*. 2001
126. Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagai J, Kudo M, Sherwood OD, Hsueh AJW. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science*. 2002
127. Bani D, Bigazzi M. Clinical aspects and therapeutic perspectives of relaxin. *Curr Med Chem-Immunol, Endocr Metab Agents*. 2005
128. Samuel CS, Du XJ, Bathgate RAD, Summers RJ. Relaxin' the stiffened heart and arteries: the therapeutic potential for relaxin in the treatment of cardiovascular disease. *Pharm Ther*. 2006
129. Bani Sacchi T, Bigazzi M, Bani D, Mannaioni PF, Masini E. Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Br J Pharmacol*. 1995
130. Samuel CS, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RA, Layfield SL, Mak J, Tregear GW, Du XJ. Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology*. 2003
131. Perna AM, Masini E, Nistri S, Briganti V, Chiappini L, Stefano P, Bigazzi M, Pieroni C, Bani Sacchi T, Bani D. Novel drug development opportunity for relaxin in acute myocardial infarction: evidences from a swine model. *FASEB J*. 2005
132. Dschietzig T, Unemori E, Wood S, Boehmer J, Richter C, Baumann G, Teichman S, Stangl K. A pilot safety and dose-finding trial of intravenous recombinant relaxin in compensated congestive heart failure (abstr. 2438). *Eur Heart J*. 2007
133. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004
134. Silvertown JD, Ng J, Sato T, Summerlee AJ, Medin JA. H2 relaxin overexpression increases in vivo prostate xenograft tumor growth and angiogenesis. *Int J Cancer*. 2006
135. Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*. 2005.

136. Benvenuti S, Saccardi R, Luciani P, Urbani S, Deledda C, Cellai I, Francini F, Squecco R, Rosati F, Danza G, Gelmini S, Greeve I, Rossi M, Maggi R, Serio M, Peri A. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells: changes in the expression of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Exp Cell Res.* 2006
137. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 2004
138. Gerdes HH, Bukoreshtliev NV, Barroso JF. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett.* 2007
139. Crescioli C, Squecco R, Cosmi L, Sottili M, Gelmini S, Borgogni E, Sarchielli E, Scolletta S, Francini F, Annunziato F, Vannelli GB, Serio M. Immunosuppression in cardiac graft rejection: a human in vitro model to study the potential use of new immunomodulatory drugs. *Exp Cell Res.* 2008
140. Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006
141. Scobioala S, Klocke R, Kuhlmann M, Tian W, Hasib L, Milting H, Koenig S, Stelljes M, El-Banayosy A, Tenderich G, Michel G, Breithardt G, Nikol S. Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J.* 2008
142. Braun T, Martire A. Cardiac stem cells: paradigm shift or broken promise? A view from developmental biology. *Trends Biotechnol.* 2007
143. Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, Marey MV, Galkina SI, Isaev NK, Sheval EV, Polyakov VY, Sukhikh GT, Zorov DB. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in coculture. *J Cell Mol Med.* 2008
144. Muller-Borer BJ, Cascio WE, Esch GL, Kim HS, Coleman WB, Grisham JW, Anderson PA, Malouf NN. Mechanisms controlling the acquisition of a cardiac phenotype by liver stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007
145. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation.* 2003
146. Boni A, Urbanek K, Nascimbene A, Hosoda T, Zheng H, Delucchi F, Amano K, Gonzalez A, Vitale S, Ojaimi C, Rizzi R, Bolli R, Yutzey KE, Rota M, Kajstura J, Anversa P, Leri A. Notch1 regulates the fate of cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008
147. Fahrenbach JP, Mejia-Alvarez R, Banach K. The relevance of non-excitabile cells for cardiac pacemaker function. *J Physiol.* 2007
148. Parry LJ, Wilson BC, Poterski RS, Summerlee AJ. The cardiovascular effects of porcine relaxin in Brattleboro rats. *Endocrine.* 1998

*Ringrazio le mie Prof., Lucia Formigli e Sandra Zecchi, che mi hanno dato l'opportunità di intraprendere questo percorso e che mi hanno dato tanto, sia da un punto di vista professionale che umano.*

*Ringrazio i miei compagni di viaggio, la Dott.ssa Alessia Tani, che stimo moltissimo e con cui ho condiviso tanti momenti, i Dott. Flaminia Chellini, Daniele Nosi e Chiara Sassoli...tutti loro mi hanno insegnato qualcosa...*

*ma il ringraziamento più grande va alla mia famiglia, la colonna portante della mia vita...*

*A tutti voi un grazie di cuore!*