

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**



**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E  
FUNZIONALI**

***DOTTORATO DI RICERCA  
IN IMAGING MOLECOLARE  
XXIII CICLO***

*Coordinatore: Prof. Marco Salvatore*

**IMAGING MULTIMODALE PET/TC  
IN CAMPO PRECLINICO:  
STUDIO DI UN MODELLO MURINO  
DI INFARTO DEL MIOCARDIO**

**Relatore: Prof. Arturo Brunetti**

**Candidata: Dott.ssa Sara Gargiulo**

**Corelatore: Prof. Alberto Cuocolo**

# INDICE

---

▪ <b>INTRODUZIONE</b>	3
▪ I modelli sperimentali murini nella ricerca cardiovascolare	4
▪ Anatomia comparata del cuore umano e murino	5
▪ Modelli murini di patologie cardiovascolari umane	9
▪ Metodiche per lo studio dei modelli murini nella ricerca cardiovascolare	11
▪ Genomica e Proteomica	11
▪ Esame istologico	13
▪ Indagini ematochimiche	13
▪ Diagnostica per Immagini	14
▪ Modelli sperimentali murini di infarto del miocardio	19
▪ Imaging Molecolare Multimodale mediante PET/TC nei modelli murini di infarto del miocardio	26
▪ Radiofarmaci PET per lo studio dei modelli murini di infarto del miocardio	28
▪ Aspetti tecnici degli scanner PET/TC dedicati per lo studio dei modelli murini di infarto del miocardio	29
▪ Preparazione del topo all'esame PET/TC per lo studio dei modelli murini di infarto del miocardio	33
▪ Post-processing delle immagini PET/TC nei modelli murini di infarto del miocardio	38
▪ <b>BASE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E SCOPO DEL LAVORO</b>	42
▪ <b>MATERIALI E METODI</b>	43
▪ Modello murino di infarto del miocardio	43
▪ Preparazione del topo per studi PET/TC cardiaci	45
▪ PET/TC imaging del cuore	47
▪ Post-processing delle immagini PET/TC cardiache	49
▪ <b>ANALISI STATISTICA DEI DATI</b>	52
▪ <b>RISULTATI</b>	53
▪ Database normale	53
▪ Analisi PET qualitativa e quantitativa dei soggetti infartuati	60
▪ Riproducibilità intra- ed inter-osservatore	66
▪ Monitoraggio longitudinale mediante PET/TC dei soggetti infartuati	67
▪ Analisi mediante PET/TC di un modello murino geneticamente modificato di infarto miocardico	74
▪ <b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	77
▪ <b>BIBLIOGRAFIA</b>	80
▪ <b>ICONOGRAFIA</b>	92

**Grazie Mamma**  
**per avermi dato gli insegnamenti,**  
**la forza e l'amore**  
**di una madre e di un padre.**

## **INTRODUZIONE**

I recenti progressi tecnologici nei settori scientifici della genomica, proteomica e metabolomica hanno determinato l'evoluzione della visione tradizionale della medicina, tesa prevalentemente a rimuovere i disturbi provocati da una patologia, verso il moderno approccio "molecolare", che mira alla comprensione ed al trattamento precoce delle alterazioni genetiche e biochimiche alla base delle malattie. Parallelamente, le tecniche di imaging si sono evolute da indagini prettamente morfologiche, volte ad evidenziare alterazioni strutturali di organi e tessuti, ad indagini "molecolari", capaci di fornire informazioni sulle alterazioni funzionali e metaboliche che si manifestano nei primi stadi di una patologia. L'innovativo approccio molecolare ha dunque contribuito significativamente a migliorare la tempestività delle diagnosi, il monitoraggio dell'evoluzione delle malattie e lo sviluppo di nuove terapie [1]. Le patologie cardiovascolari, ed in particolare la cardiomiopatia ischemica, sono attualmente annoverate tra le principali cause di morbilità e mortalità nel mondo occidentale. Pertanto, la comunità scientifica nutre un forte interesse nel perfezionare l'iter diagnostico e sviluppare programmi preventivi e terapeutici innovativi per le cardiopatie. La comprensione della patogenesi e dell'evoluzione dell'ischemia del miocardio e lo sviluppo di nuove terapie si sono evolute di pari passo con la sperimentazione biomedica sui modelli animali. Attualmente i modelli animali rappresentano degli strumenti insostituibili per migliorare la prevenzione, la diagnosi e la terapia dell'ischemia del miocardio nell'uomo. Le potenzialità di manipolazione genetica nei roditori da laboratorio hanno consentito di migliorare la comprensione di fondamentali aspetti genetici e fisiopatologici delle malattie cardiovascolari umane. In particolare, la crescente disponibilità di numerosi ceppi di topo (*Mus Musculus*) geneticamente modificati, ha condotto alla loro progressiva affermazione rispetto ad altri modelli animali. L'imaging preclinico nei topi da laboratorio ha apportato un

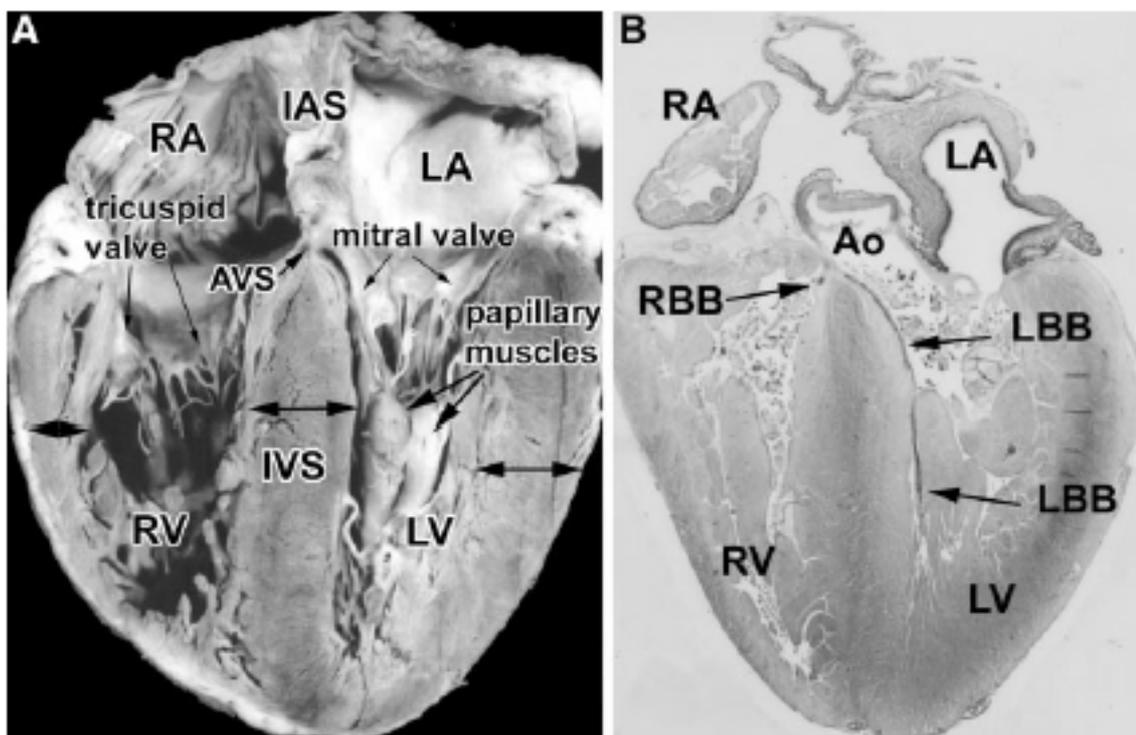
contributo rilevante alla ricerca cardiovascolare. La traslazione delle metodiche di imaging dal modello animale all'uomo non è semplice ed in particolare, il loro impiego nel topo per lo studio del cuore è complicata da una serie di fattori, come le ridotte dimensioni e l'elevata frequenza cardiaca. Pertanto, gli studi di diagnostica per immagini sul cuore del topo richiedono alta risoluzione spaziale e temporale. Diverse metodiche di imaging, come l'Ecocardiografia, la Tomografia Computerizzata a raggi X (TC), la Risonanza Magnetica (RM), la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) e la Tomografia ad Emissione di Singolo Fotone (SPECT) consentono di studiare in vivo, in modo non invasivo e longitudinale, la morfologia, il metabolismo e la funzionalità cardiaca. In particolare, l'impiego di tecniche di Imaging morfo-funzionale integrato, come PET/TC o PET/RM, permettono di valutare in vivo processi molecolari che avvengono a livello cellulare e contemporaneamente ottenere informazioni anatomiche ad alta risoluzione [2-3].

## **I modelli sperimentali murini nella ricerca cardiovascolare**

Il topo (*Mus musculus*) ha conquistato popolarità come modello sperimentale nella ricerca biomedica in quanto presenta diversi vantaggi, quali le piccole dimensioni, la facile manipolazione, il breve ciclo riproduttivo (21 giorni di gestazione) e l'elevata prolificità, la pratica e relativamente economica stabulazione. Nell'ultimo decennio inoltre, gli enormi progressi nei settori della biologia e della genetica molecolare, le innovazioni tecnologiche nel campo della microchirurgia e la dimostrazione di significative analogie nell'organogenesi e nell'anatomia del cuore tra uomo e topo, hanno condotto all'affermazione del topo come modello di prima scelta anche nella ricerca cardiovascolare [11-12].

## § Anatomia comparata del cuore umano e murino

Il topo da laboratorio (*Mus musculus*) rappresenta attualmente il principale modello animale per lo studio di alterazioni cardiache morfo-funzionali congenite o acquisite. E' indispensabile, tuttavia, per la corretta estrapolazione e traslazione dei risultati sperimentali dal modello animale all'uomo, confrontare dettagliatamente morfogenesi ed anatomia del cuore nelle due specie. Diverse pubblicazioni scientifiche descrivono in maniera comparata lo sviluppo dell'apparato cardiovascolare nel topo e nell'uomo [4-7]. Nonostante alcune differenze, l'anatomia di base del cuore nell'uomo e nel topo è molto simile e pertanto l'impiego del topo come modello nella ricerca cardiologica appare appropriato [7] [Fig. 1].



**Figura 1.** A) anatomia del cuore umano B) sezione istologica del cuore di topo

Ao: aorta; AVS: setto atrioventricolare; IAS: setto interatriale; LA: atrio sx;

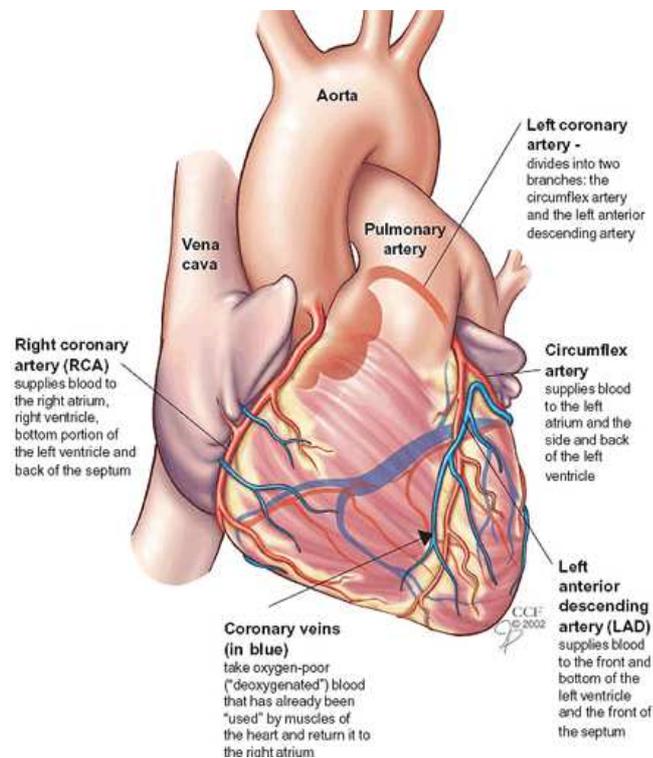
LBB: branca sinistra del fascio di His; RV: ventricolo destro.

Da Wessels A et al. *Method Mol Biol* 2000; 136: 239-259

Durante lo sviluppo fetale dell'uomo, la definitiva suddivisione delle camere cardiache si completa nei primi due mesi di gestazione e l'assetto morfologico definitivo del cuore matura nella vita prenatale. Nel topo la suddivisione delle camere cardiache si completa in due settimane, e la maturazione delle strutture cardiache si protrae nella vita neonatale. Il cuore umano ha un peso di circa 250 grammi ed una frequenza cardiaca media di 65 battiti al minuto, in confronto a quello di un topo, che pesa circa 0.2 grammi e presenta una frequenza media di 600 battiti al minuto. Nell'uomo, il cuore è adagiato sul diaframma, e mostra una forma approssimativamente piramidale ed una superficie dorsale piatta. Nel topo, invece, data la stazione quadrupedale, il cuore non è a contatto con il diaframma ed ha una forma più ellissoidale. Infine, lo sviluppo delle cavità atriali è proporzionalmente maggiore nell'uomo rispetto al topo. In entrambe le specie, il cuore è suddiviso in 4 camere, 2 atri, separati dal setto interatriale e due ventricoli, separati dal setto interventricolare. Tra i setti interatriale ed interventricolare si individua un breve segmento settale atrioventricolare, che si estende dal tratto di efflusso subartico del ventricolo sinistro all'atrio destro: nell'uomo questo tratto è rappresentato da una sottile struttura fibrosa ed è denominato "setto membranoso", mentre nel topo è costituito da uno sdoppiamento muscolare del lembo settale della valvola tricuspide ed appare relativamente spesso. L'assetto delle valvole atrio-ventricolari nel topo e nell'uomo è comparabile: la valvola atrio-ventricolare sinistra o "mitrale" ha due lembi, quella destra o "tricuspide" ha tre lembi. In entrambe le specie, le estremità dei lembi valvolari atrio-ventricolari sono in continuità con i muscoli papillari attraverso le corde tendinee, che appaiono meno pronunciate nel topo. La superficie interna dei ventricoli è caratterizzata da numerose sporgenze dette "trabecole carnee", che nell'uomo risultano più spesse nel ventricolo destro. In entrambe le specie, nelle cavità ventricolari è possibile distinguere a livello apicale delle sottili strutture simili a tendini, dette "falsi

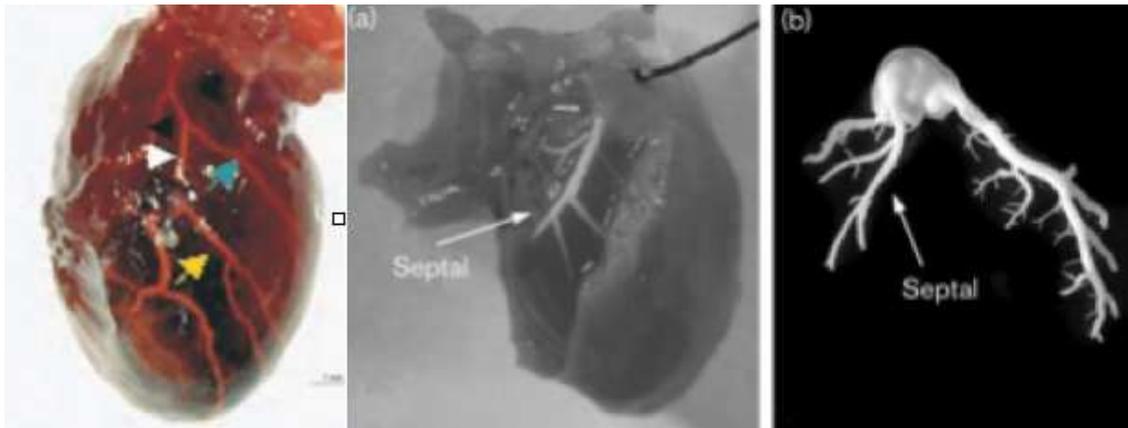
tendini”, che rappresentano un’estensione della rete subendocardica del sistema di conduzione, formata da cellule del Purkinje immerse in una matrice fibrosa. Nel cuore umano, il setto interventricolare è una struttura muscolare molto robusta, con uno spessore comparabile o superiore alla parete libera del ventricolo sinistro, mentre nel topo appare meno spesso e si assottiglia gradualmente verso l’apice. L’orientamento del cono di efflusso dell’aorta rispetto al setto interventricolare appare leggermente diverso tra le due specie. Le principali differenze anatomiche tra il sistema cardiovascolare del topo e dell’uomo riguardano l’assetto del polo venoso alla base del cuore. Nell’uomo l’atrio sinistro riceve quattro vene polmonari, mentre nel topo le vene polmonari confluiscono in un unico vaso prima di sboccare dorsalmente nella cavità atriale sinistra. Nell’uomo la vena cava craniale sinistra regredisce nel corso dello sviluppo fetale, dando origine con la parte distale al legamento di Marshall ed alla vena obliqua, e con la porzione prossimale al seno coronario, che sbocca nell’atrio destro [9]. Nel topo la vena cava craniale sinistra non regredisce nella vita post-natale ed è connessa alla vena azigos sinistra; il seno coronario è costituito pertanto dal segmento terminale della vena cava craniale sinistra che decorre dalla vena azigos all’atrio destro. Il seno coronario nel topo riceve sangue sia dalla circolazione sistemica sia dalle vene cardiache, che decorrono sulla superficie del cuore in posizione subepicardica [10]. L’anatomia delle arterie coronarie nel topo presenta alcune differenze rispetto all’uomo. Nel topo si individua una cospicua *arteria coronaria settale*, che origina dal seno di Valsalva o come una branca prossimale dalla arteria coronaria destra e decorre lungo il solco interventricolare, provvedendo alla perfusione del miocardio del ventricolo destro e del setto interventricolare. Nell’uomo invece questo distretto è perfuso dalle *arterie settali perforatrici*, che originano dall’arteria coronaria discendente anteriore sinistra o dall’arteria coronaria discendente posteriore. Nell’uomo l’*arteria coronaria sinistra* si divide prossimamente in *arteria coronaria discendente*

*anteriore sinistra e arteria circumflessa*, mentre nel topo decorre obliquamente lungo la parete laterale del ventricolo sinistro e si dirama in modo variabile, analogamente all'arteria intermedia dell'uomo. A differenza dell'uomo, dunque, il topo non possiede un'arteria coronaria discendente anteriore sinistra propriamente detta, mostra una lieve variabilità tra gli individui nella fisionomia delle diramazioni dell'arteria coronaria sinistra e possiede una distinta arteria coronaria settale. Pertanto la legatura dell'arteria coronaria sinistra nel topo, che mima la cardiomiopatia ischemica coronarica dell'uomo, induce un infarto del miocardio con estensione variabile, che può interessare la parete ventricolare sinistra antero-laterale, posteriore e apicale, risparmiando il setto interventricolare [11-12]. Nel topo l'arteria coronaria destra si divide prossimamente in un *ramo ventricolare destro* e in un'arteria *circumflessa*, deputata all'irrorazione della parete ventricolare sinistra posteriore.



**Figura 2.** Anatomia delle arterie coronarie nell'uomo

Da [my.clevelandclinic.org](http://my.clevelandclinic.org)



**Figura 3.** Anatomia delle arterie coronarie nel topo

A) la punta di freccia gialla indica l'*arteria diagonale*; la punta di freccia azzurra indica l'*arteria circonflessa*; la punta di freccia bianca indica l'*arteria discendente sinistra*.

Da Tellez *et al* 2004; *Cardiovascular Pathology* 13:91-97

B) *Arteria coronaria settale* nel topo (calco con Silastic "in situ" ed immagine di sottrazione).

Da Kumar *et al* 2005; *Coronary Artery Disease* 16:41-44

Anche l'anatomia del sistema di conduzione presenta alcune differenze tra le due specie, in particolare nel topo il nodo seno-atriale è localizzato in corrispondenza della vena cava craniale destra, al di sopra della sua giunzione con l'atrio destro, piuttosto che in corrispondenza del pavimento dell'atrio stesso [13].

## § Modelli murini di patologie cardiovascolari umane

Recentemente sono stati sviluppati numerosi modelli murini geneticamente modificati, in cui specifici geni, coinvolti nello sviluppo di malformazioni cardiache o altre patologie cardiovascolari, sono overespressi, deleti o mutati. I topi *knockout*, *conditional knockout*, *knockin* e *transgenici* offrono l'opportunità unica di valutare l'effetto di specifici geni come singola variabile indipendente, in una popolazione con caratteristiche genetiche ben definite ed in cui lo stato di salute, l'età, il sesso ed altre

variabili possono essere strettamente controllate. Inoltre, nell'ultimo decennio le pratiche chirurgiche sperimentali sui modelli animali nella ricerca cardiovascolare sono state in gran parte traslate dal ratto al topo, grazie anche alla crescente disponibilità di sempre più sofisticati microscopi per microdissezione, di strumenti microchirurgici di precisione, di sistemi monitoraggio dei parametri vitali, di anestesia e ventilazione polmonare assistita specificamente dedicati a piccoli roditori da laboratorio, consentendo pertanto di ottimizzare le procedure interventistiche, e limitare il numero di animali impiegati e la variabilità sperimentale. I modelli murini impiegati nella ricerca cardiovascolare possono essere ottenuti mediante tecniche di manipolazione genetica, interventi chirurgici, modificazioni ambientali, somministrazione di farmaci o inoculazione di agenti patogeni. Queste metodiche fondamentali possono essere proficuamente combinate tra loro, testando ad esempio gli effetti di fattori esogeni su un particolare substrato genetico. Le manipolazioni del genoma murino hanno portato alla creazione di un numero crescente di topi geneticamente modificati recanti malformazioni cardiache che mimano patologie cardiache congenite umane [9]. In letteratura sono inoltre riportati svariati modelli murini di cardiomiopatia su base genetica. Ad esempio, l'ipertrofia cardiaca si sviluppa spontaneamente in topi transgenici per la fosfoinositolo-3 chinasi (PI3K) [14] oppure overesprimenti i recettori per l' "Insulin-like growth factor 1" (IGF1) [15]. Modelli di cardiomiopatia dilatativa ed insufficienza cardiaca sono rappresentati da topi transgenici overesprimenti la forma dominante-negativa della proteina p21<sup>ras</sup> [16], un importante fattore di crescita per i miocardiociti, oppure recanti mutazioni dei geni codificanti per le proteine del citoscheletro o difettivi per i geni della distrofina e utrofina [11;17]. Ceppi murini *knockout* per i recettori per l'apolipoproteina E (apoE) o per le lipoproteine a bassa densità (LDL) rappresentano interessanti modelli per lo studio dell'aterosclerosi [18]. Ancora, sono riportati in letteratura diversi topi *knockin*, *knockout* e *transgenici* che

rappresentano modelli di aritmie cardiache dell'uomo [19]. Modelli sperimentali murini di cardiomiopatia possono essere anche riprodotti con tecniche diverse dalla manipolazione genetica, come l'esercizio fisico, modificazioni della dieta, procedure chirurgiche o inoculazione di agenti patogeni. Ad esempio, l'ipertrofia del ventricolo sinistro può essere indotta sottoponendo i topi ad un programma di allenamento fisico costante come il nuoto [20], oppure determinando un sovraccarico pressorio mediante la costrizione chirurgica (*banding*) dell'aorta ascendente [12]. Analogamente, la sindrome legata alla stenosi congenita dell'arteria polmonare nell'uomo può essere mimata nel topo mediante *banding* dell'arteria polmonare. I modelli murini di infarto del miocardio e di ischemia / riperfusione miocardica sono ampiamente descritti in letteratura e riprodotti mediante legatura chirurgica definitiva o temporanea dell'arteria coronaria sinistra [ 2; 12]. Le procedure chirurgiche possono essere eseguite su topi *transgenici*, *knockout* e *wild-type*. Infine, sono riportati in letteratura modelli murini di aterosclerosi riprodotti mediante opportune modificazioni della dieta [18] o di miocardite indotta mediante inoculazione del virus dell'encefalomiocardite [21].

## **Metodiche per lo studio dei modelli murini nella ricerca cardiovascolare**

### **§ Genomica e Proteomica**

Il termine anglosassone "*omics*" viene impiegato attualmente per indicare le discipline che integrano le informazioni derivanti dai geni ("*genomica*"), dall'RNA messaggero ("*transcriptomica*"), dalle proteine ("*proteomica*") e da composti organici a basso peso molecolare ("*metabolomica*") [22] per comprendere i meccanismi cellulari alla base delle patologie, ad esempio le disfunzioni cardiache. Ampi studi di genomica, transcriptomica e proteomica sono stati condotti nell'uomo in corso di diverse malattie

cardiache [22], come la coronaropatia e l'ischemia acuta e cronica del miocardio [23]. Queste metodiche sono adottate anche per l'analisi di modelli murini di cardiopatia, data l'elevata omologia genetica e proteomica con l'uomo. Diversi lavori scientifici riportano l'analisi genomica [12] e proteomica dei principali organi del topo, tra cui anche il cuore, sia in condizioni fisiologiche [24] sia in corso di patologie, ad esempio nella cardiomiopatia dilatativa [25] o nell'insufficienza cardiaca in topi *knockout* per il fosfolambano [26]. L'analisi dei profili d'espressione genica mediante sofisticate tecniche come la "microarray", consente di individuare i geni la cui trascrizione è attivata in maniera differente in varie patologie. Queste informazioni consentono di monitorare le modificazioni dell'espressione genetica in diverse fasi di una malattia o a seguito di una procedura chirurgica, e dunque di definire le tappe fisiopatologiche fondamentali di una cardiopatia sperimentalmente indotta, ad esempio la progressione dell'ipertrofia ventricolare sinistra in risposta a sovraccarico pressorio indotto mediante *banding* aortico dalla fase compensata a quella di insufficienza cardiaca. Le più recenti generazioni di *microarrays*, ad esempio, possono valutare l'espressione di più di 34.000 geni. Gli svantaggi di questa metodica sono rappresentati dalla sua applicazione *ex vivo*, dagli elevati costi, dai lunghi tempi di esecuzione e dall'elevato numero di variabili che possono inficiare la precisione dei risultati, quali errori di misurazione, mancata standardizzazione delle tecniche di estrazione dell'RNA o di ibridizzazione [12]. I progressi tecnologici nel campo della spettrometria e della bioinformatica hanno consentito di identificare e quantificare migliaia di proteine da tessuti normali o patologici. L'analisi delle variazioni nell'espressione proteica del tessuto miocardico in condizioni patologiche, mediante spettrometria o elettroforesi, fornisce importanti informazioni sul piano diagnostico e terapeutico.

## **§ Esame istologico**

L'istomorfometria rappresenta tuttora la tecnica di riferimento per la valutazione morfostrutturale delle lesioni cardiache e dell'efficacia di potenziali trattamenti su modelli murini di cardiomiopatia.

Il tessuto miocardico può essere fissato, incluso e tagliato in sezioni dello spessore di pochi  $\mu\text{m}$ , per essere successivamente sottoposto a valutazione istologica previa colorazione, comunemente con ematossilina ed eosina (HE) [2]. Altre colorazioni utili per lo studio del tessuto cardiaco sono l'Evans Blue e trifeniltetrazoliumcloride (TTC) [2], il sirius red [4] e la colorazione tricromica di Masson [27]. Con queste colorazioni è possibile, ad esempio, visualizzare e misurare accuratamente l'estensione di un'area di ischemia miocardica con l'ausilio di un microscopio a trasmissione ed un opportuno software di elaborazione immagini. Il vantaggio della valutazione istologica è rappresentato dalla possibilità di distinguere il tessuto sano da quello danneggiato già dopo poche ore dall'ischemia e di poter effettuare misurazioni precise dell'area d'infarto. Attualmente l'istomorfometria rappresenta la tecnica di riferimento anche per la validazione di misurazioni ottenute mediante metodiche di imaging. Gli svantaggi sono rappresentati dalla sua applicazione ex vivo, dai lunghi tempi di preparazione del campione e la minore accuratezza nelle misurazioni per l'Evans Blue [2].

## **§ Indagini ematochimiche**

E' possibile determinare la concentrazione plasmatica degli enzimi cardiaci, quali la creatina-kinasi e l'isoenzima I della deidrogenasi, per valutare il danno subito dalle cellule cardiache, ad esempio in seguito ad ischemia miocardica [2].

## § Diagnostica per Immagini

Diverse metodiche di imaging, come l'Ecocardiografia, la Tomografia Computerizzata a raggi X (TC), la Risonanza Magnetica (RM), la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) e la Tomografia Computerizzata ad Emissione di Singolo Fotone (SPECT) sono correntemente impiegate sia in campo clinico che nella ricerca preclinica per valutare l'anatomia, la funzionalità, la perfusione ed il metabolismo del cuore. Attualmente il confine tra imaging "morfologico" e "molecolare" appare sempre più sfumato e metodiche tradizionalmente dedicate all'analisi anatomo-funzionale cardiaca, come l'Ecografia o la Risonanza Magnetica, sono utilizzate con successo anche per visualizzare e misurare processi biologici a livello cellulare e subcellulare, mediante l'ausilio di specifiche sonde molecolari [28]. La diffusione delle metodiche di imaging nella sperimentazione biomedica ha rappresentato una innovazione rilevante, perché ha consentito di studiare i modelli animali *in vivo*, in modo non invasivo e longitudinale, monitorando in uno stesso soggetto l'evoluzione di una patologia o la risposta ad una terapia. L'avanzamento tecnologico delle apparecchiature per imaging preclinico è avvenuto parallelamente ed in accordo con lo sviluppo delle scienze degli animali da laboratorio e la maturazione di un impiego sempre più consapevole, razionale ed eticamente corretto dei modelli animali sperimentali. Infatti le tecniche di imaging, consentendo lo studio dei modelli animali in vivo, in modo non invasivo e ripetuto nel tempo, hanno permesso sia di migliorare l'accuratezza e l'attendibilità dei risultati sperimentali, sia di ridurre significativamente il numero di animali impiegati nella ricerca, in accordo col principio etico del "Replacement, Reduction, Refinement" enunciato da Burch e Russell nel 1959. Per favorire la ricerca traslazionale, sono state sviluppate diverse apparecchiature per imaging dedicate ai piccoli animali da laboratorio. L'estensione delle modalità di imaging cardiaco dall'uomo al topo presenta alcune problematiche legate principalmente alle differenze di dimensioni e frequenza

cardiaca tra le due specie. Ad esempio, i valori medi del diametro e dello spessore parietale del ventricolo sinistro e del setto interventricolare nel topo si aggirano rispettivamente intorno ai 2.0, 1.5 ed 1.3 mm, mentre il diametro delle arterie coronarie del topo è di circa 0.16 mm, rispetto ai 3.7 mm dell'uomo [13]. La frequenza cardiaca media nell'uomo è circa 10 volte più bassa (65 battiti al minuto) rispetto al topo (600 battiti al minuto). Pertanto, appare fondamentale per eseguire studi di imaging sul cuore del topo, disporre di apparecchiature con alta risoluzione spaziale e temporale. Nell'ultimo decennio hanno inoltre trovato ampia diffusione gli scanner ibridi dedicati, che associano metodiche di Imaging complementari, come SPECT o PET e TC oppure PET ed RM. L'imaging multimodale ha il vantaggio di fornire una precisa localizzazione anatomica della distribuzione del tracciante molecolare e di permettere la correzione per l'attenuazione dei fotoni da parte dei tessuti corporei e degli errori di volume parziale, che possono inficiare l'accuratezza delle valutazioni quantitative. L'Ecografia in modalità B-mode, M-mode e Doppler rappresenta attualmente la tecnica di imaging più diffusa per lo studio dell'apparato cardiovascolare, sia in campo clinico che nella ricerca preclinica. L'Ecocardiografia consente di effettuare una valutazione morfologica e funzionale del cuore in tempo reale, in modo non invasivo e relativamente economico, senza ricorrere a radiazioni ionizzanti. Applicazioni convenzionali dell'ecocardiografia sono rappresentate dalla valutazione della struttura cardiaca, della funzione sistolica e diastolica del ventricolo sinistro, della perfusione del miocardio e, con l'ausilio dell'ecoDoppler, dei parametri emodinamici. L'impiego del mezzo di contrasto ecografico favorisce la visualizzazione dell'interfaccia sangue-miocardio e la misurazione della perfusione tissutale. L'imaging molecolare con l'ecografia si basa sull'utilizzo di mezzi di contrasto strutturati in modo da legarsi a specifici bersagli molecolari presenti sulle cellule endoteliali o in ambiente extravascolare, come i recettori di membrana VCAM-1, VEGF o  $\alpha_v\beta_3$ .

L'evidenziazione di marcatori dei processi di flogosi ed angiogenesi risulta utile ad esempio in caso di lesioni aterosclerotiche, di ischemia e rimodellamento del miocardio [28-29]. In passato è stato descritto l'utilizzo di apparecchi ecografici convenzionali, dotati di sonde con frequenza di 15 MHz, per lo studio dell'apparato cardiovascolare nel topo. Tuttavia, la loro limitata risoluzione spaziale (risoluzione laterale 250  $\mu\text{m}$ ; risoluzione assiale 100  $\mu\text{m}$ ) non è apparsa adeguata per esaminare accuratamente le strutture cardiache ed i parametri emodinamici in questa specie. Inoltre, un altro parametro importante per l'imaging cardiaco nel topo è la risoluzione temporale. Per visualizzare accuratamente la fase telesistolica e telediastolica occorrono almeno 15 frame per ciclo cardiaco, ed aggirandosi la frequenza cardiaca media del topo intorno ai 600 battiti al minuto, è necessario un *frame rate* di almeno 150 Hz [30]. Pertanto sono stati sviluppati negli ultimi anni degli apparecchi ecografici definiti "Biomicroscopi ad Ultrasuoni", dotati di sonde con frequenza compresa tra 40 e 200 MHz e caratterizzati da altissima risoluzione spaziale (circa 50  $\mu\text{m}$ ) [31] e frame rate tra 120 e 600 Hz. Queste apparecchiature offrono una risoluzione spaziale e temporale ed una profondità di penetrazione ideali per la fenotipizzazione dell'apparato cardiovascolare in modelli murini transgenici o chirurgici [32-34]. Recentemente si sta diffondendo nella ricerca preclinica l'impiego dell'ecocardiografia tridimensionale, per eseguire valutazioni accurate della massa e del volume ventricolari anche in modelli murini di cardiopatia, come l'infarto del miocardio, in cui il ventricolo sinistro assume una forma asimmetrica [35]. La TC fornisce immagini tomografiche e tridimensionali del cuore e, attraverso l'acquisizione di immagini volumetriche in diverse fasi del ciclo cardiaco, consente di ricostruire anche immagini in 4D, utili per un'accurata valutazione del volume e della contrattilità ventricolari [36]. La TC cardiaca è utilizzata in campo clinico per lo studio delle arterie coronarie e per la diagnosi di aneurismi aortici, embolismo polmonare e malattie pericardiche. L'impiego di mezzi di contrasto iodati migliora la

visualizzazione dei vasi sanguigni e permette di discernere tra tessuto miocardico sano e danneggiato. Per ridurre gli artefatti da movimento, può essere registrato un tracciato elettrocardiografico (ECG) simultaneamente all'acquisizione TC, che può essere successivamente utilizzato in modo prospettico o retrospettivo in fase di ricostruzione per ottenere scansioni sincronizzate con una determinata fase del ciclo cardiaco ("gating"). Analogamente, le acquisizioni TC possono essere sincronizzate con le fasi del ciclo respiratorio [29]. Per ottenere nel topo acquisizioni TC con un dettaglio anatomico del cuore comparabile all'uomo, è necessario impiegare una risoluzione spaziale di almeno 100  $\mu\text{m}$ . Inoltre, data l'elevata frequenza cardiaca (600 battiti al minuto) e respiratoria del topo (50 atti respiratori al minuto), è richiesta una risoluzione temporale di circa 50 ms, rispetto ai 300 ms per l'uomo. Pertanto, negli studi preclinici su piccoli animali da laboratorio, sia *in vivo* che su campioni *ex vivo*, vengono impiegati scanner TC dedicati, ad alta risoluzione spaziale e temporale, designati col termine "micro-TC" [37]. In letteratura è descritta la valutazione TC del cuore del topo *ex vivo*, con risoluzione spaziale di 25  $\mu\text{m}$ , ottenendo ricostruzioni tridimensionali con un buon dettaglio anatomico. Lo studio *in vivo* del cuore nel topo con micro-TC è problematico per una serie di fattori. Negli scanner micro-TC è possibile migliorare la risoluzione spaziale, temporale e di contrasto aumentando l'intensità del flusso di fotoni X emessi dal tubo radiogeno, incrementando però la dose di radiazioni ionizzanti somministrate al soggetto esaminato. Pertanto, per le acquisizioni *in vivo* non possono essere impiegate le alte risoluzioni utilizzate *ex vivo*. Inoltre, data l'elevata frequenza cardiaca e respiratoria del topo, gli artefatti creati dal movimento del muscolo cardiaco e dall'escursione respiratoria della parete toracica sono significativi, e pertanto, per una valutazione morfo-funzionale ottimale del cuore in questa specie, sono indispensabili acquisizioni "gating". Poiché l'attenuazione dei raggi X da parte del sangue e del miocardio è molto simile, per ottenere immagini micro-TC di alta qualità spesso si

ricorre all'impiego di mezzi di contrasto. Nel topo i mezzi di contrasto iodati tradizionalmente usati in campo clinico cominciano ad essere filtrati dal rene circa 30 secondi dopo la somministrazione endovenosa in singolo bolo. Pertanto nel topo è preferibile utilizzare mezzi di contrasto dedicati, caratterizzati da lunga persistenza nel letto vascolare, per differenziare il sangue dal muscolo cardiaco e misurare ad esempio il volume ventricolare, la frazione d'eiezione o la gettata cardiaca in soggetti normali o in modelli chirurgici di ischemia del miocardio [36-38]. L'uso di tecniche di acquisizione e protocolli operativi più sofisticati (*delayed-enhancement cine 3D micro-CT*) permettono anche di distinguere il miocardio infartuato da quello sano e di misurare accuratamente l'estensione dell'area d'infarto [39]. La RM è una tecnica di imaging che non utilizza radiazioni ionizzanti, ma si basa sull'energia a radiofrequenza assorbita e riemessa in condizioni di risonanza dai nuclei di idrogeno presenti nei tessuti. Questa metodica è diffusamente impiegata in campo clinico per valutare l'anatomia cardiaca, la funzione ventricolare e per determinare, in maniera precisa e con elevata risoluzione temporale e di contrasto, la massa, la vitalità, la perfusione ed il metabolismo energetico del miocardio. L'impiego di mezzo di contrasto a base di gadolinio consente inoltre di determinare in maniera accurata l'estensione dell'infarto del miocardio [29]. Una tipica immagine RM del cuore nell'uomo presenta una risoluzione per voxel di  $5 \text{ mm}^3$ . Gli scanner RM dedicati per piccoli animali da laboratorio presentano un elevato campo magnetico, compreso tra 1.5 e 11.75 T, per raggiungere un'elevata risoluzione spaziale, di circa  $0.00144 \text{ mm}^3$ . Poiché il segnale RM è estremamente sensibile al movimento, per evitare artefatti è indispensabile effettuare acquisizioni sincronizzate con determinate fasi del ciclo cardiaco e respiratorio [36]. In letteratura è descritto l'impiego dell'RM nel topo *in vivo* per la determinazione della massa, del volume e della frazione di eiezione del ventricolo sinistro [40] e per valutare le valvole cardiache e le arterie coronarie [41]. Le tecniche

di Imaging Nucleare, come la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) e la Tomografia Computerizzata ad Emissione di Singolo Fotone (SPECT), rappresentano le principali modalità di imaging molecolare, in quanto sono caratterizzate da elevata sensibilità e dalla disponibilità di una vasta gamma di radiotraccianti per applicazioni cliniche e precliniche. Con queste metodiche è possibile valutare la perfusione e la vitalità del miocardio, la funzione sistolica ventricolare e processi biologici come l'apoptosi, l'infiammazione e l'angiogenesi in corso di patologie cardiovascolari, quali l'aterosclerosi, l'infarto del miocardio ed il rimodellamento del ventricolo sinistro. Attualmente, la PET rappresenta la tecnica di imaging nucleare più affermata, in quanto presenta una sensibilità ed una risoluzione spaziale migliori rispetto alla SPECT [28]. Nonostante le difficoltà relative alle ridotte dimensioni del cuore ed alla elevata frequenza cardiaca nel topo, in letteratura sono descritti diversi studi PET cardiaci in questa specie, utilizzando scanner dedicati ad alta risoluzione. Gli studi PET in piccoli animali da laboratorio offrono l'opportunità di valutare il metabolismo, la perfusione e l'espressione genica a livello miocardico in maniera non invasiva, ripetuta nel tempo e di misurare parametri quantitativi [42]. Inoltre, attraverso acquisizioni con *gating* cardiaco e respiratorio è possibile ridurre significativamente gli artefatti da movimento, migliorando così l'accuratezza delle misurazioni quantitative, ed è possibile stimare nel topo anche parametri anatomo-funzionali, quali il volume ventricolare telesistolico e telediastolico, la frazione di eiezione e la gettata cardiaca [42-43].

### **Modelli sperimentali murini di infarto del miocardio**

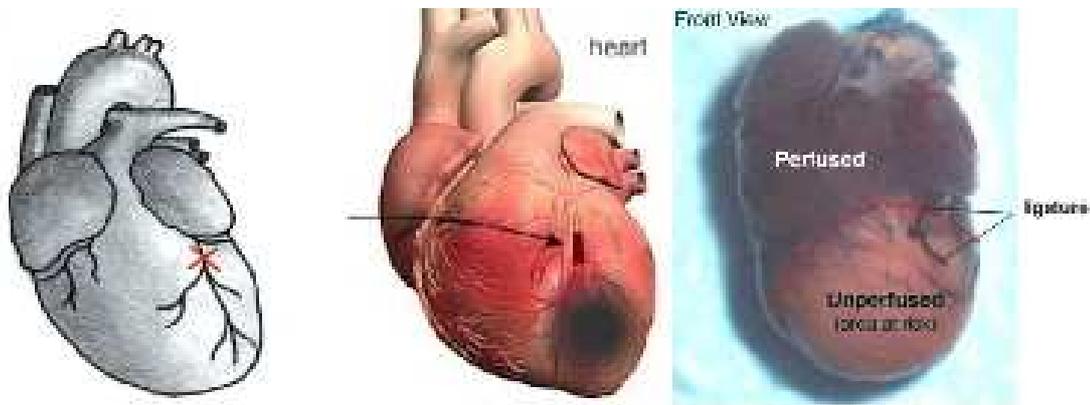
La coronaropatia nell'uomo può manifestarsi con quadri clinici e lesioni anatomopatologiche di gravità variabile, inducendo disfunzioni cardiache la cui severità è proporzionale alla durata dell'occlusione vascolare. L'ischemia cardiaca transitoria può essere definita come un danno miocardico provocato da uno squilibrio tra

perfusione coronarica e fabbisogno energetico del muscolo cardiaco. La manifestazione clinica caratteristica di questa condizione patologica è rappresentata dall'insorgenza di un dolore acuto nella regione precordiale, noto come "angina pectoris", ma nei soggetti diabetici o trapiantati alcuni episodi possono verificarsi in maniera subclinica. In questi casi, se l'occlusione delle arterie coronarie viene risolta entro 20 minuti circa, si osserva il fenomeno definito "*stunning*", cioè un deficit contrattile temporaneo del miocardio ventricolare, senza compromissione della vitalità. L'infarto acuto del miocardio può essere definito come un danno necrotico irreversibile del muscolo cardiaco, causato da una severa e prolungata riduzione del flusso coronarico. La riperfusione del miocardio viene descritta come il ripristino spontaneo o indotto mediante opportuna terapia, del flusso ematico attraverso le arterie coronarie. I fenomeni di ischemia e riperfusione inducono una intensa risposta infiammatoria, che rappresenta un ulteriore insulto per i miocardiociti [2]. I modelli animali che mimano la patogenesi e le caratteristiche dell'infarto del miocardio e dello scompenso cardiaco ad esso conseguente possono essere sviluppati con diversi metodi. Nell'uomo la coronaropatia è correlata alla stenosi cronica da parte di placche aterosclerotiche delle arterie coronarie, oppure alla loro occlusione acuta ad opera di formazioni trombotiche. Nei modelli animali la formazione di placche aterosclerotiche può essere indotta attraverso la manipolazione genetica o somministrando specifiche diete ad alto contenuto di colesterolo. Tuttavia l'incidenza e la sede dell'occlusione delle arterie coronarie in questi modelli è imprevedibile e l'eziologia è differente da quella che si riscontra nell'uomo. Diverse patologie cardiovascolari umane, come l'ischemia miocardica, possono essere sperimentalmente riprodotte attraverso procedure microchirurgiche. In base alla durata ed all'estensione del deficit di perfusione del miocardio ventricolare, si distinguono modelli chirurgici di infarto (MI), di danno ischemico acuto e riperfusione (I/R) e di ischemia cronica del miocardio. L'induzione

chirurgica della stenosi o dell'occlusione delle arterie coronarie ha il vantaggio di consentire una precisa cronologia, localizzazione, estensione e riproducibilità della coronaropatia [44]. Negli ultimi anni sia topi *wild-type* che *transgenici* hanno rappresentato i principali modelli animali chirurgici di coronaropatia, testando così l'effetto di specifici geni sull'evoluzione della cardiomiopatia ischemica e sull'effetto di nuovi approcci terapeutici. Recentemente ad esempio, è stato studiato il ruolo della metalloproteasi 7 (MMP-7) nel rimodellamento ventricolare e nella genesi di aritmie post-infarto, eseguendo la legatura dell'arteria coronaria sinistra in topi *wild-type* e *knockout*, così come per l'apolipoproteina E, per valutare l'influenza dell'aterosclerosi sull'evoluzione dell'insufficienza cardiaca post-infarto. I modelli chirurgici murini di infarto miocardico rappresentano inoltre utili strumenti per testare l'efficacia di approcci terapeutici innovativi, ad esempio agenti inibitori dell'apoptosi oppure cellule staminali [44]. La principale difficoltà nell'esecuzione di procedure di chirurgia cardiovascolare sul topo è rappresentata dalle ridotte dimensioni cardiache e delle arterie coronarie, per cui è necessario disporre di una serie di attrezzature dedicate, come uno stereomicroscopio per microdissezione, che consenta una adeguata magnificazione, di strumenti per microchirurgia, di tracheotubi e ventilatori meccanici specificamente studiati per l'uso nel topo. I primi a descrivere un modello chirurgico murino di ischemia del miocardio furono Michael e colleghi nel 1995. Per realizzare questo modello sperimentale, il topo viene sottoposto ad anestesia parenterale o inalatoria e posizionato in decubito dorsale su un lettino termoriscaldato. La profondità del piano anestesilogico viene valutata saggiando il riflesso digitale, e, quando viene giudicata adeguata, si procede alla tricotomia e disinfezione del campo operatorio. Per eseguire la toracotomia, il topo deve essere sottoposto ad intubazione tracheale e ventilazione assistita. L'intubazione del topo risulta piuttosto indaginosa e non scevra da complicanze e può essere realizzata attraverso la cavità orale oppure previa

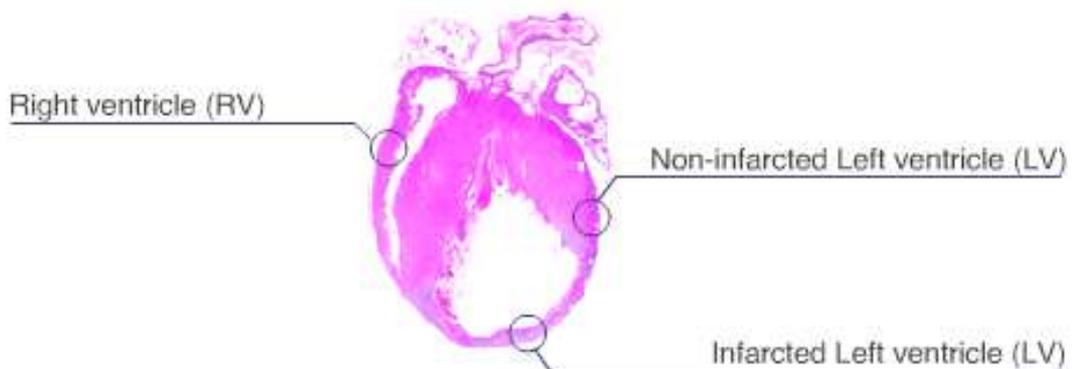
tracheotomia/tracheostomia, utilizzando specifici tracheotubi metallici o cateteri endovenosi di teflon 18-20 gauge opportunamente modificati. In letteratura sono descritti svariati e più o meno complessi dispositivi “self-made” per migliorare la visualizzazione della glottide ed il tasso di successo della procedura [45-50]. Per attenuare il riflesso laringeo, può risultare utile applicare una goccia di lidocaina all’1% sulla punta del tracheotubo. Una volta posizionato, il tubo endotracheale verrà raccordato ad un ventilatore meccanico dedicato per piccoli roditori da laboratorio, a sua volta collegato ad un circuito che veicola 2 Lt/min di ossigeno ed eventualmente un anestetico inalatorio, settando opportunamente il volume tidale (in media 120 µl) e la frequenza respiratoria (in media 133 atti respiratori al minuto). Il corretto posizionamento del tracheotubo è indicato dalla ritmica espansione della gabbia toracica in sincronia con la frequenza respiratoria impostata per il ventilatore [2]. Prima dell’incisione chirurgica, viene eseguita un’anestesia locale di infiltrazione, iniettando nel sottocute della parete toracica 100 µl di una soluzione di lidocaina all’1%. La toracotomia viene realizzata generalmente a livello del IV° spazio intercostale sinistro, mediante un’incisione di circa 8 mm di cute e sottocute, a 2 mm di distanza dal margine sternale, seguita da dissezione smussa dei muscoli intercostali esterni ed interni ed incisione della pleura parietale. Per evitare un’eccessiva perdita ematica, bisogna prestare attenzione a non ledere i vasi intercostali e la vena toracica superficiale. Un retrattore deve essere delicatamente applicato per ampliare la breccia operatoria senza danneggiare i lobi polmonari, ed il cuore deve essere visualizzato dislocando il timo o il grasso mediastinico. Il sacco pericardico deve essere aperto con delicatezza, evitando il danneggiamento della parete della vena cava craniale sinistra, per visualizzare la parte superiore dell’atrio sinistro ed i grossi vasi. L’arteria coronaria sinistra appare come un vaso rosso brillante pulsante, che origina al di sotto dell’auricola sinistra e decorre al centro della parete cardiaca verso l’apice. Questo vaso può essere legato con un filo da

sutura 7-0, 1-2 mm al di sotto della punta dell'auricola sinistra, per indurre un'ischemia del 40-50% della parete ventricolare sinistra. Quando si esegue la legatura del vaso, è importante evitare sia di penetrare con l'ago nella cavità ventricolare sia di inserirlo troppo superficialmente, rischiando di disseccare la parete ventricolare. L'occlusione dell'arteria è confermata dalla modificazione del colore della parete anteriore del ventricolo sinistro, che diviene pallido [Fig. 2-3].



**Figura 4.** Infarto del miocardio mediante legatura dell'arteria coronaria sinistra nel topo.

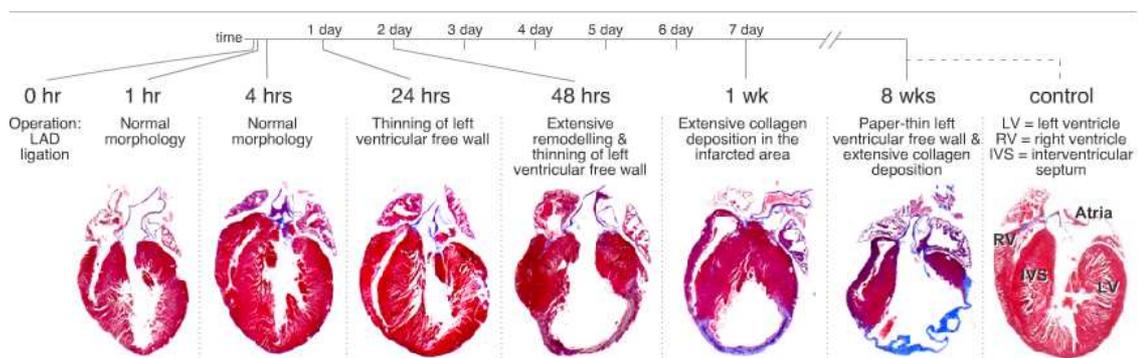
Da [www.cardiogenomics.org](http://www.cardiogenomics.org)



**Figura 5.** Sezione istologica di cuore murino con infarto indotto mediante legatura dell'arteria coronaria sinistra, colorazione H&E.

Da [www.cardiogenomics.org](http://www.cardiogenomics.org)

Prima di suturare la breccia operatoria, è importante assicurarsi della corretta reinsufflazione polmonare, ocludendo con le dita per pochi secondi il tratto espiratorio del circuito di ventilazione. Infatti, il collasso dei lobi polmonari può esitare in *distress* respiratorio post-chirurgico. La parete toracica viene dunque richiusa, legando tra di loro la IV° e la V° costa con un filo da sutura riassorbibile 6-0 e suturando piano muscolare, sottocute e cute [12]. In letteratura è riportato un tasso di mortalità associato all'induzione chirurgica dell'infarto miocardico nel topo compreso tra 37 e 50 %. La morte si verifica a volte entro un'ora dalla procedura chirurgica, per l'insorgenza di episodi di tachicardia ventricolare maligna, la cui incidenza può essere ridotta mediante somministrazione sublinguale di 10-50 µg di nitroglicerina [44] oppure applicando una goccia di lidocaina all'1% sull'apice cardiaco [12]. Per favorire il recupero post-operatorio è necessario monitorare accuratamente la temperatura corporea e la respirazione dei topi, utilizzando dispositivi termici, somministrando ossigeno fino al completo risveglio ed analgesici per 48 ore. L'infarto del miocardio è associato ad una profonda alterazione dell'architettura globale del ventricolo, detta “*rimodellamento ventricolare*”, con assottigliamento della parete del ventricolo sinistro entro 48 ore ed estesa deposizione di collagene nell'area infartuata dopo 1 settimana [Fig. 4].



**Figura 6.** Sezioni istologiche di cuore murino: modificazioni anatomopatologiche dopo l'induzione di infarto mediante legatura dell'arteria coronaria sinistra, colorazione Tricromica di Masson.

Per realizzare un modello di ischemia del miocardio seguita da riperfusione, l'arteria coronaria sinistra viene occlusa temporaneamente, interponendo un tubicino di materiale plastico di circa 1mm di diametro tra il filo da sutura ed il vaso, in modo da rimuovere facilmente la legatura dopo un determinato periodo di tempo, ad esempio 60 minuti [12]. L'ischemia è confermata dall'impallidimento della parete anteriore del ventricolo sinistro, mentre la riperfusione è indicata dall'iperemizzazione della stessa area miocardica. Una frequente complicanza post-chirurgica è rappresentata dalla fibrillazione ventricolare a seguito della riperfusione, la cui incidenza può essere ridotta somministrando 6 mg/kg di lidocaina per via intraperitoneale subito dopo aver eseguito la legatura dell'arteria coronaria sinistra e immediatamente prima della sua rimozione. Il modello chirurgico di I/R è caratterizzato da un'intensa infiltrazione di cellule infiammatorie e da un attenuato rimodellamento fibrotico ed angiogenesi nell'area infartuata. Per minimizzare l'interferenza delle procedure chirurgiche sull'evoluzione del processo infiammatorio, sono state sviluppate anche delle tecniche chirurgiche meno invasive, che prevedono l'utilizzo di specifici dispositivi impiantabili per realizzare l'occlusione dell'arteria coronaria sinistra [2; 44]. In sintesi, dopo la toracotomia, un sottile filo da sutura viene fatto passare al di sotto dell'arteria coronaria sinistra e le estremità del filo vengono inserite in un tubicino di polietilene ed esteriorizzate attraverso la breccia operatoria, che viene suturata. L'esperimento di I/R può essere pertanto realizzato attraverso questo dispositivo alcuni giorni dopo la procedura chirurgica, quando il processo infiammatorio ad essa conseguente si è ormai risolto. Infine, Miller e colleghi nel 1994 descrissero per primi la realizzazione di un modello di I/R con "precondizionamento", riproducendo 5 cicli di occlusione dell'arteria coronaria sinistra, della durata di 5 minuti, seguiti da riperfusione di analoga durata e successivamente un periodo di 30 minuti di occlusione dell'arteria, seguita da

2 ore di riperfusione. Con questo protocollo è stata dimostrata una riduzione dell'estensione dell'area d'infarto di circa il 50 %.

### **Imaging Molecolare Multimodale mediante PET/TC nei modelli murini di infarto del miocardio**

L'imaging cardiaco tradizionale si basa sulla valutazione di modificazioni anatomo-funzionali, come il flusso ematico o la funzione contrattile. L'imaging molecolare fornisce piuttosto informazioni sui meccanismi biochimici e cellulari alla base delle malattie, come l'alterato metabolismo energetico, l'infiammazione, l'apoptosi e l'angiogenesi, favorendo una diagnosi precoce e l'impiego terapie innovative. Attualmente la Tomografia ad Emissione di Positroni ha trovato ampia diffusione in campo clinico per diagnosticare la coronaropatia e valutare la vitalità del miocardio. In particolare, la misurazione dell'estensione dell'area d'infarto miocardico è di fondamentale importanza per formulare valutazioni prognostiche e terapeutiche dopo un evento ischemico acuto [28; 51]. La metodologia per quantificare l'area d'infarto miocardico mediante PET è stata ben definita nell'uomo, mentre risulta più complessa da attuare nella sperimentazione con i piccoli roditori. In generale, l'imaging cardiaco nei topi è molto difficile da realizzare, a causa delle loro limitate dimensioni corporee, del ridotto volume ventricolare e dell'elevata frequenza cardiaca. Pertanto, sono state sviluppate apparecchiature dedicate per piccoli animali da laboratorio, caratterizzate da elevata risoluzione spaziale e temporale e da alta sensibilità, che hanno apportato un contributo notevole per la traslazione clinica dei risultati sperimentali nel campo della medicina molecolare. Attualmente, l'istomorfometria rappresenta il *gold standard* per la quantificazione dell'estensione dell'area di infarto miocardico nei piccoli roditori, anche per validare nuovi approcci basati sull'imaging. Tuttavia essa presenta lo svantaggio di essere applicata *ex vivo* e dunque non può fornire misurazioni seriali sullo

stesso animale, utili per monitorare l'evoluzione di una malattia o la risposta ad un trattamento. L'interesse a sviluppare anche in campo preclinico metodi accurati e non invasivi, basati sull'Imaging, per valutare l'estensione dell'area d'infarto è dunque rilevante, in quanto offrirebbe l'opportunità di indagare *in vivo* i cambiamenti metabolici e funzionali che seguono l'evento ischemico e l'impatto di terapie chirurgiche o farmacologiche. In letteratura è riportato che la quantificazione dell'estensione dell'area d'infarto nel topo può essere eseguita in modo preciso e ripetibile mediante SPECT [53], PET [4], TC [39] ed RM [54]. In particolare, la Tomografia ad Emissione di Positroni si è progressivamente affermata anche in campo preclinico per valutare metabolismo e vitalità del miocardio. Questa metodica offre diversi vantaggi, come l'alta risoluzione spaziale e l'elevata sensibilità [55]. La PET fornisce ricostruzioni tridimensionali e pertanto risulta particolarmente adatta rispetto ad altre tecniche, come l'ecocardiografia bidimensionale, per eseguire un accurato esame volumetrico della cavità ventricolare sinistra e del miocardio infartuato, che subiscono eterogenee modificazioni nella forma e nello spessore [51]. Attraverso la PET inoltre, è possibile determinare la concentrazione dei traccianti molecolari a livello miocardico, grazie anche all'avvento di software dedicati per la ricostruzione delle immagini e per la quantificazione dei radiofarmaci nel cuore dei roditori.

Svantaggi della PET sono rappresentati dall'uso di radiazioni ionizzanti e dai limiti intrinseci di risoluzione spaziale di questa metodica (1-3 mm FWHM). Inoltre la PET non consente una precisa localizzazione anatomica delle lesioni. Pertanto risulta estremamente vantaggioso associarla ad altre tecniche di Imaging che forniscano un dettaglio morfo-strutturale accurato, come TC o RM. Attualmente si è ampiamente diffuso nella ricerca cardiovascolare l'utilizzo dei sistemi di imaging ibrido PET/TC, più vantaggiosi dal punto di vista tecnico ed economico rispetto agli scanner integrati con RM. L'associazione tra scanner micro-PET e micro-TC non solo consente la

precisa determinazione della sede anatomica dei bersagli molecolari, ma anche di migliorare l'accuratezza delle misurazioni quantitative, attraverso la correzione dell'errore di volume parziale e la correzione per l'attenuazione, che potrebbero tradursi in una sottostima della reale distribuzione regionale del radiotracciante.

## **§ Radiofarmaci PET per lo studio dei modelli murini di infarto del miocardio**

Le alterazioni del metabolismo miocardico sono fondamentali nella patogenesi di molte malattie cardiovascolari. L'infarto miocardico, in particolare, è associato a numerosi cambiamenti biochimici e funzionali nel tessuto infartuato, nella zona a rischio e nel miocardio remoto. L'imaging PET consente la valutazione e la quantificazione in vivo, in modo non-invasivo e ripetuto nel tempo, di diversi parametri quali la perfusione, il metabolismo, l'apoptosi e l'espressione genica a livello miocardico. Inoltre le acquisizioni PET con *gating* cardiaco e respiratorio permettono di analizzare parametri anatomici e funzionali, come la forma del ventricolo sinistro, il volume telediastolico e telesistolico, la gittata sistolica, la gittata cardiaca, la frazione di eiezione e la contrattilità [42]. I radiofarmaci PET attualmente più utilizzati per la valutazione del flusso ematico a livello miocardico sono  $^{13}\text{N}$ -ammoniaca,  $^{82}\text{Rb}$  e  $\text{H}_2^{15}\text{O}$  [51]. Gli studi PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-RGD, un peptide ciclico che riconosce in modo specifico i recettori  $\alpha v\beta 3$ , è utile per valutare l'angiogenesi in seguito ad ischemia del miocardio. In letteratura è descritto uno studio PET preclinico con  $^{11}\text{C}$ -epinefrina, che dimostrerebbe una compromissione della captazione e dello stoccaggio delle catecolamine a livello miocardico dopo l'induzione sperimentale dell'infarto. Diversi radiotraccianti sono in grado di discriminare il tessuto miocardico danneggiato da quello vitale e consentono la valutazione quantitativa dell'estensione dell'infarto.

Il  $^{82}\text{Rb}$  fornisce sostanzialmente informazioni sull'integrità delle cellule. Gli studi PET con  $^{11}\text{C}$ -palmitato o con svariati composti con struttura analoga agli acidi grassi radiomarcanti con  $^{18}\text{F}$  sono utili per studiare il metabolismo cardiaco degli acidi grassi, in quanto un evento ischemico induce l'utilizzo a livello miocardico del glucosio come substrato energetico preferenziale al posto degli acidi grassi, per un tempo prolungato. La valutazione quantitativa della captazione di  $^{18}\text{F}$ -FDG è un metodo riconosciuto nella pratica clinica per valutare la vitalità del tessuto miocardico nei pazienti con malattia coronarica e funzione ventricolare sinistra compromessa. Rispetto ad altri traccianti, il  $^{18}\text{F}$ -FDG è di più facile approvvigionamento nella maggior parte dei centri PET e fornisce immagini con migliore risoluzione [42]. Il  $^{18}\text{F}$ -FDG è un indicatore dell'assorbimento e della fosforilazione del glucosio da parte dei miocardiociti e può essere utilizzato per quantificarne il metabolismo. La captazione di FDG riflette l'attività dei vari trasportatori del glucosio e dell'esochinasi, ma a differenza del glucosio-6-fosfato, l'FDG-6-fosfato non viene ulteriormente metabolizzato e rimane intrappolato nelle cellule. Questo radiofarmaco è utile anche per valutare l'infiammazione acuta conseguente al danno miocardico da ischemia-riperfusion e al processo di rimodellamento ventricolare. Ancora, l'imaging con  $^{11}\text{C}$ -acetato permette di valutare il metabolismo ossidativo cardiaco.

### **§ Aspetti tecnici degli scanner PET/TC per lo studio dei modelli murini di infarto del miocardio**

Il primo scanner PET dedicato per lo studio dei piccoli animali da laboratorio fu commercializzato nel 1995 col nome di "RATPET" [56]. Da allora il principale obiettivo tecnologico è stato ottimizzare la risoluzione spaziale di queste

apparecchiature, che attualmente si attesta intorno al millimetro. La risoluzione spaziale degli scanner PET preclinici è circa 10 volte superiore a quella degli scanner clinici, aspetto fondamentale se si considera che, ad esempio, il cuore umano è di dimensioni 10 volte maggiori di quello murino, così come la frequenza cardiaca di un topo è 10 volte più elevata dell'uomo. La qualità e la definizione delle immagini PET ottenibili mediante uno scanner clinico con risoluzione spaziale di circa 10-15 mm è paragonabile a quelle fornite da una micro-PET con risoluzione spaziale approssimativamente di 1mm [57].



**Figura 7.** Comparazione della qualità di immagini PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG del cuore nell'uomo e nel topo.

Da Riemann B et al *Q J NUCL MED MOL IMAGING* 2008; 52:215-221

L'impiego di sistemi PET dedicati offre inoltre il chiaro vantaggio di separare fisicamente l'ambiente di lavoro clinico da quello preclinico, aspetto auspicabile per motivi igienico-sanitari e legislativi [57-59]. Un problema tecnico rilevante negli scanner per piccoli animali da laboratorio è ottenere allo stesso tempo un'adeguata risoluzione spaziale ed un'alta sensibilità. In uno scanner PET dedicato, il cui sistema di detezione è rappresentato, analogamente agli scanner clinici, da cristalli scintillatori (BGO, LSO(Ce), GSO(Ce) ), la risoluzione spaziale può essere migliorata riducendo le

dimensioni dei cristalli stessi. D'altra parte, questo comporta una diminuzione dell'area coperta da ogni singolo detettore e dunque della sensibilità del sistema. Inoltre, la riduzione delle dimensioni dei detettori comporta l'aumento del numero di raggi gamma che incidono obliquamente sulla superficie dei detettori, degradando ulteriormente la risoluzione spaziale dal centro alla periferia del campo di vista a causa dell'errore di parallasse. Attualmente lo scanner PET dedicato con più alta risoluzione spaziale è il "quadHIDAC", il cui sistema di detezione è rappresentato da lamine di piombo forate ed assemblate in multistrato, intervallate a materiale isolante, che convertono i raggi gamma incidenti in elettroni, registrati poi da camere di ionizzazione. Questo particolare sistema di detezione, in associazione all'utilizzo di un algoritmo di ricostruzione "*resolution recovery*", consente di raggiungere la risoluzione spaziale di 1mm FWHM [56-57]. La metodica PET è caratterizzata da due intrinseci limiti fisici alla massima risoluzione spaziale raggiungibile: il "*range*" del positrone ed il fenomeno della non colinearità dei fotoni di annichilazione. Ad esempio, i positroni emessi dal [ $^{18}\text{F}$ ] percorrono una certa distanza prima dell'annichilazione, producendo un effetto "*blurring*" pari a 0.1-0.2 mm FWHM, mentre i raggi gamma in coincidenza a  $180^\circ$  presentano una deviazione probabilistica di  $\pm 0.25^\circ$ , che comporta un'ulteriore *blurring* di 0.3 mm per una distanza di 15 cm dai detettori. Pertanto, il limite fisico di risoluzione per il [ $^{18}\text{F}$ ] è pari a circa 0.6 mm. L'influenza di quest'ultimo fenomeno sulla risoluzione spaziale può essere ridotta diminuendo le dimensioni del *gantry* e dunque la distanza tra i detettori. Un altro fattore importante per la qualità delle immagini PET è la sensibilità del sistema, definita come il numero di fotoni gamma coincidenti detettati per VOXEL. Attualmente la sensibilità media riportata sia per gli scanner clinici che preclinici si attesta intorno al 2-4% al centro del campo di vista, anche e alcuni scanner dedicati possono raggiungere valori dell' 8-10% [58]. La sensibilità è determinata principalmente dal materiale, dallo spessore e dalla

geometria dei detettori, dalla quantità di radioattività all'interno del campo di vista, dal tempo di scansione e dall'algoritmo di ricostruzione delle immagini implementato [59]. Per migliorare la sensibilità, attraverso la detezione di un numero adeguato di coincidenze, la dose di radiofarmaci analoghi di composti endogeni, come il [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG per il glucosio, può essere incrementata senza particolari problemi, mentre per sonde di bersagli molecolari presenti nei tessuti in concentrazione nanomolare è conveniente incrementare l'attività specifica per aumentare la dose di radioattività iniettata [60]. L'incremento del numero di coincidenze registrate può essere ottenuto anche aumentando il tempo di acquisizione, ma questa strategia è limitata da alcuni fattori quali l'emivita del radionuclide impiegato, la *clearance* del radiofarmaco e la durata dell'anestesia dell'animale [57]. Poiché la PET non consente una precisa localizzazione anatomica delle lesioni, risulta vantaggioso associarla a metodiche complementari, che forniscano un dettaglio morfo-strutturale ad alta risoluzione, prevalentemente TC con detettori "flat panel" e sorgente di raggi X microfocale assemblati in un *gantry* rotante. L'imaging multimodale può essere realizzato con scanner separati o integrati in un'unica apparecchiatura, in modo da favorire una precisa coregistrazione delle immagini. L'integrazione con gli scanner micro-TC permette inoltre di effettuare la correzione per l'attenuazione dei fotoni e migliorare l'accuratezza delle misurazioni quantitative, anche se questo fenomeno è meno importante nel topo rispetto all'uomo, in quanto il corpo di un topo con diametro medio di circa 3 cm attenua soltanto il 23% dei fotoni [55]. Le acquisizioni PET/TC possono essere sincronizzate con la fase diastolica del ciclo cardiaco e la fase espiratoria di quello respiratorio, utilizzando elettrodi per ECG e sensori respiratori pediatrici o dedicati e implementando specifici software per la registrazione e l'elaborazione dei parametri vitali, con lo scopo di ottimizzare la qualità delle immagini e l'accuratezza delle valutazioni quantitative. Uno svantaggio dell'associazione tra PET e TC è l'ulteriore esposizione a radiazioni

ionizzanti. Infatti, per garantire una adeguata risoluzione spaziale e di contrasto, è indispensabile incrementare significativamente il flusso di raggi-X: ad esempio, un'acquisizione TC con risoluzione spaziale di 135  $\mu\text{m}$  comporta una dose di radiazioni X pari a 250mGy, mentre uno scanner clinico generalmente non supera la dose di 50mGy. Anche se le dosi di radiazioni riportate in letteratura per acquisizioni micro-TC *in vivo* nel topo non superano la dose letale specie-specifica ( $\text{LD}_{50} \sim 6\text{Gy}$ ), ripetute esposizioni a dosi limitate di raggi X possono sortire effetti biologici, ad esempio sulla crescita tumorale o l'ematopoiesi, interferendo anche con i risultati sperimentali [37].

## **§ Preparazione del topo all'esame PET/TC per lo studio dei modelli murini di infarto del miocardio**

Parallelamente all'avanzamento tecnologico degli scanner preclinici PET/TC si è assistito al perfezionamento dei protocolli operativi propedeutici all'esecuzione degli esami di imaging sui piccoli roditori da laboratorio. Numerosi fattori possono influenzare la cinetica e la biodistribuzione dei radio farmaci nei vari organi e tessuti. Pertanto gli studi PET in campo clinico, che prevedono ad esempio l'impiego di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, sono condotti seguendo procedure standard per la preparazione del paziente. Al contrario, i protocolli operativi descritti per eseguire indagini PET sui modelli animali sono estremamente variabili. All'atto della pianificazione di un protocollo sperimentale, comprendente studi PET seriali su un modello murino di cardiopatia, devono essere tenute in considerazione diverse variabili, non sempre facili da bilanciare tra loro, come la preparazione del topo per l'imaging, modalità e tempi di somministrazione del radiofarmaco ed anestesia. Poiché il topo presenta un metabolismo basale circa 7 volte più rapido dell'uomo, fattori come la temperatura ambientale, il digiuno o l'attività muscolare possono influenzare in modo ancora più

marcato la biodistribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nei vari organi, cuore compreso. Ad esempio, nell'uomo è prassi comune mantenere i pazienti in ambiente caldo prima e durante la scansione PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, per ridurre la captazione del grasso bruno interscapolare e paravertebrale, che può comportare problemi nella corretta interpretazione delle immagini PET della regione toracica [61]. Analogamente, è riportato in letteratura che l'esecuzione degli studi PET nel topo, in un ambiente con temperatura mantenuta nella cosiddetta "zona di termoneutralità" (30-34 °C) comporta la riduzione significativa della captazione di FDG da parte del grasso bruno interscapolare e della muscolatura paraspinale [62]. Inoltre, poiché il grasso bruno interscapolare presenta una fitta innervazione simpatica [61], qualunque fattore stimoli la liberazione delle catecolamine, come lo stress derivante da una manipolazione poco delicata o da prolungato contenimento, determina un incremento della captazione dell'FDG a questo livello, interferendo con l'ottimale visualizzazione del cuore. A riposo, il miocardio utilizza gli acidi grassi a lunga catena come fonte principale di energia, ma il substrato energetico preferenziale può essere rapidamente commutato nel glucosio, ad esempio in caso di stimolazione da parte delle catecolamine o dell'insulina, oppure in risposta ad ischemia acuta [63]. In topi a digiuno, il miocardio utilizza preferenzialmente gli acidi grassi a lunga catena e dunque mostra una ridotta captazione di glucosio o del suo analogo FDG [64]. Negli studi PET clinici con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG è prassi comune ricorrere al protocollo di stimolazione con carico di glucosio e somministrazione di insulina per migliorare la qualità delle immagini e l'accuratezza diagnostica (*hyperinsulinemic euglycemic clamp technique*) [65]. Questo protocollo è stato applicato con successo anche in studi PET del cuore nel ratto [65] e nel topo [63], per standardizzare le condizioni metaboliche degli animali esaminati ed incrementare la captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello miocardico. La somministrazione

intraperitoneale di 8mU/g di insulina umana e 1 mg/g di glucosio trenta minuti prima della iniezione endovenosa di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, seguita da un'acquisizione PET statica dopo 30 minuti di biodistribuzione, è stata impiegata con buoni risultati nel ratto [65] ed ha prodotto nel topo un incremento di circa 50 volte della captazione miocardica del tracciante [63]. In generale il volume del bolo di radiofarmaco iniettato per via endovenosa non può superare il limite di 5% del volume ematico complessivo, pari a 200  $\mu\text{l}$  per il topo, pena la morte dell'animale per ipervolemia iatrogena ed edema polmonare. Anche in relazione a questo parametro, i radiofarmaci con breve emivita sono caratterizzati da un tempo massimo di utilizzo nei piccoli roditori. Inoltre col trascorrere del tempo la loro attività specifica si riduce, aumentando quindi il numero di molecole di radiofarmaco iniettate e la potenziale comparsa di effetti negativi sulla qualità delle immagini o addirittura farmacologici. Questo problema è particolarmente critico nel topo, se si considera che, in rapporto al peso corporeo, i radiofarmaci sono iniettati in quantità maggiori rispetto all'uomo per assicurare un'adeguata risoluzione spaziale. Ad esempio la dose comune di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nell'uomo è 10 mCi, mentre nel topo è 0.2 mCi che, rapportata al peso corporeo, equivale ad una dose circa 50 volte maggiore [66]. Ne consegue che gli studi PET-TC preclinici possono comportare un'elevata esposizione a radiazioni ionizzanti (mediamente tra 40 cGy per [ $^{18}\text{F}$ ] PET e 250 mGy per una scansione micro-TC 135  $\mu\text{m}$ ) soprattutto in caso di studi seriali, che potrebbero sortire effetti biologici, ed influenzare i risultati sperimentali [37; 66]. La modalità di somministrazione del radiofarmaco è un altro parametro da definire nell'ambito del protocollo sperimentale. I radiotraccianti vengono comunemente somministrati nel topo per via endovenosa o intraperitoneale. Negli studi PET preclinici la tecnica di iniezione preferenziale è quella endovenosa, in quanto la cinetica di biodistribuzione è più rapida, prevedibile e traslabile in campo umano. In letteratura è

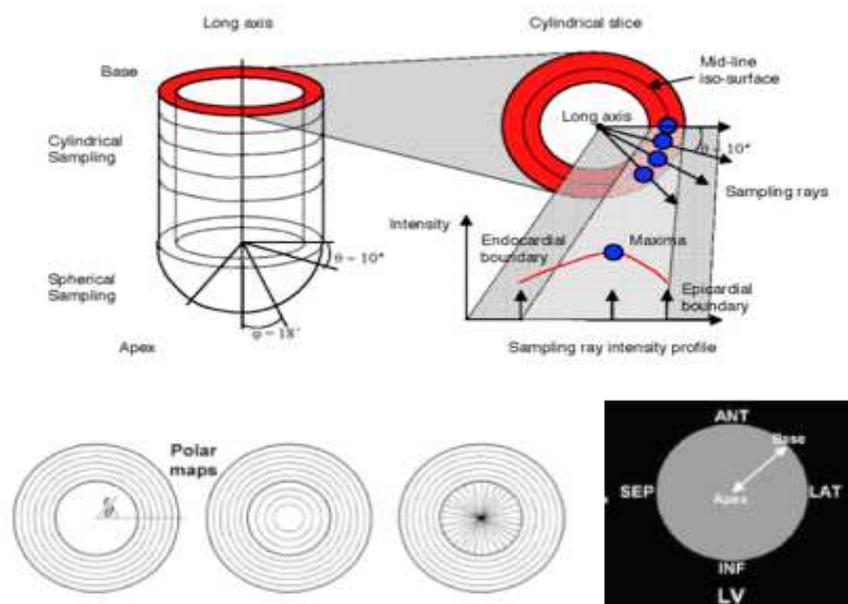
riportato che la somministrazione intraperitoneale di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG comporta maggiore variabilità nella cinetica del radiofarmaco dopo 30 minuti di biodistribuzione [63], mentre dopo 60 minuti dall'iniezione del bolo non si apprezzano significative differenze tra le due vie di somministrazione [62]. A causa del ridotto calibro della vena caudale laterale, l'iniezione endovenosa nel topo spesso esita in una parziale extravasazione del radiotracciante. Pertanto, per valutare correttamente la dose iniettata, dovrebbe essere stimata la quota di radiofarmaco depositatasi nei tessuti perivasali mediante una scansione PET statica di 2 minuti della coda [55]. Per evitare artefatti da movimento e garantire un'accurata ripetibilità del posizionamento in studi PET/TC longitudinali è indispensabile immobilizzare i topi mediante anestesia. La scelta del protocollo anestesilogico è un fattore chiave negli studi preclinici, e dovrebbe essere scelto in accordo con il tipo e la durata della procedura sperimentale e con la finalità dello studio. I topi da laboratorio presentano specifiche peculiarità anatomiche e fisiologiche che influenzano gli effetti dei farmaci anestetici. In sintesi, a causa delle ridotte dimensioni corporee, il metabolismo e l'escrezione dei farmaci sono estremamente veloci. Inoltre, presentando un elevato rischio di ipotermia, ipossia ed ipoglicemia, la durata dell'anestesia ed il monitoraggio dei parametri vitali rappresentano dei fattori estremamente critici [67]. In letteratura sono riportati diversi studi che valutano l'impatto di differenti protocolli anestesilogici sulla biodistribuzione di  $^{18}\text{F}$ -FDG nel topo, dimostrando un incremento "dose-dipendente" della captazione del radiofarmaco in rene, polmone, intestino e cuore impiegando l'isoflurano [68]. Diversamente, la captazione del radiotracciante MIBG (radio-iodio-meta-iodobenzilguanidina) è incrementata a livello di miocardio, polmoni, fegato, reni e surreni in caso di anestesia con chetamina e xylazina, verosimilmente per inibizione del rilascio di norepinefrina esercitata dagli  $\alpha_2$ -agonisti [69]. Inoltre l'anestesia influenza diversi parametri emodinamici, tra cui la perfusione miocardica. Kober et al.

(2005) [70] hanno effettuato delle misurazioni della perfusione regionale del miocardio in topi anestetizzati con due protocolli anestesiológicos di comune impiego. Essi hanno riportato che la perfusione miocardica in topi anestetizzati con chetamina 100 mg/kg e xylazina 5 mg/kg oppure con isoflurano 1.25% appare comparabile, mentre somministrando isoflurano 2% questo parametro, e di conseguenza la captazione di FDG, vengono significativamente incrementati. Infatti, l'isoflurano influenza il flusso ematico e le resistenze vascolari in vari tessuti, compreso il miocardio, esercitando un effetto vasodilatatorio sulle arterie coronarie [71], attivando l'apertura dei canali di membrana per il trasporto del potassio sotto il controllo dell'adenosina trifosfato mitocondriale [72]. Per ottimizzare la biodistribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG in studi PET sul cuore, Stegger et al. 2009 [42] hanno anestetizzato i topi con isoflurano 1.5% e iniettarono nella vena laterale caudale circa 270  $\mu\text{Ci}$  di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, eseguendo una PET statica di 30 minuti dopo un periodo di biodistribuzione di un'ora. Essi si rifanno ai risultati riportati da Fueger et al (2006) inerenti le variazioni nella biodistribuzione dell' [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nel topo sotto l'influenza di svariati fattori, quali temperatura, digiuno e protocollo anestesiológico. Essi hanno riportato che i topi, senza digiuno preliminare, mantenuti in anestesia con isoflurano 1.5% durante l'iniezione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG e durante il periodo di biodistribuzione mostrano un marcato incremento della captazione di FDG a livello cardiaco ed una significativa riduzione di captazione a livello del grasso bruno e dei muscoli scheletrici [61].

## **§ Post-processing delle immagini PET/TC nei modelli murini di infarto del miocardio**

La quantificazione della distribuzione regionale dei radiofarmaci ha rappresentato una conquista rivoluzionaria nell'ambito della cardiologia nucleare, in quanto consente di determinare diversi parametri cardiovascolari in condizioni fisiologiche e patologiche. Nell'ultimo decennio è aumentato significativamente il ricorso alla PET in pazienti affetti da coronaropatia, per la valutazione della perfusione e della vitalità miocardica in condizioni di riposo e sotto sforzo (*rest/stress*), conseguendo una maggiore accuratezza ed un migliore valore prognostico rispetto ad altre tecniche, quali ecocardiografia e SPECT [72-74]. La PET consente di misurare parametri fisiologici o farmacologici in unità assolute o, più semplicemente, in maniera semiquantitativa. Nell'uomo ed in modelli animali di grosse dimensioni corporee come il maiale è possibile quantificare in maniera assoluta la perfusione ed il metabolismo del glucosio a livello miocardico mediante una serie di acquisizioni PET dinamiche, per valutare la cinetica del radiofarmaco nel tessuto d'interesse, e la misurazione delle variazioni nel tempo della concentrazione del radiotracciante nel plasma attraverso ripetuti prelievi ematici o in modo non invasivo, valutando l'attività del sangue arterioso contenuto nella cavità ventricolare sinistra su immagini PET. Nel topo, a causa del ridotto volume ematico (mediamente 1.7 ml) e le ridotte dimensioni del ventricolo sinistro, la cinetica del radiofarmaco nel sangue non è facilmente misurabile né attraverso prelievi ematici seriali né in modo non invasivo. Pertanto, nonostante la quantificazione del tasso metabolico di utilizzo del glucosio migliori l'accuratezza della misurazione dell'estensione dell'infarto, nel topo sono comunemente adottati approcci semiquantitativi per l'analisi della distribuzione dei radiotraccianti [55-64]. Lo sviluppo di un metodo semplice, automatizzato e riproducibile per l'analisi dei dati SPECT o PET rappresenta ad oggi un obiettivo importante nella ricerca cardiovascolare.

Attualmente sono disponibili in campo clinico diversi software per effettuare l'analisi quantitativa delle immagini cardiache di medicina nucleare, secondo uno schema che si articola in alcune fasi fondamentali. Innanzitutto, l'immagine PET del ventricolo sinistro viene "segmentata", cioè isolata da ogni altra struttura circostante. Poiché le immagini PET sono generalmente acquisite con orientamento transassiale rispetto all'asse longitudinale del paziente, le immagini del cuore devono essere riorientate, definendone l'asse lungo. Molti software consentono inoltre di definire il piano valvolare e la giunzione inferiore tra ventricolo destro e sinistro. A questo punto, i dati tomografici PET del cuore possono essere rielaborati in sezioni "*in asse corto*" (dall'apice alla base, perpendicolarmente all'asse lungo del cuore), "*in asse lungo verticale*" (dalla parete posteriore all'anteriore, parallelamente all'asse lungo del cuore), "*in asse lungo orizzontale*" (dalla parete laterale al setto, parallelamente all'asse lungo del cuore), che risultano simmetriche quando il procedimento è stato eseguito correttamente. Assumendo un modello strutturale semplificato del ventricolo sinistro, descritto come una struttura cilindrica nei due terzi basali e di forma sferica all'apice, da ciascuna sezione "*in asse corto*" viene effettuato un campionamento del valore massimo di radioattività, ad intervalli regolari (30-60 punti equidistanti) e lungo dei raggi perpendicolari al miocardio, definendone la superficie, che sarà successivamente rappresentata in modo bidimensionale in un "*profilo circonferenziale*". Le superfici epicardiche ed endocardiche sono stabilite in base a valori predefiniti di deviazione standard al di sotto del valore miocardico massimo. L'insieme dei "profili circonferenziali" disposti concentricamente, ed in numero proporzionale a quello delle sezioni in asse corto del miocardio ventricolare, forma una "*mappa polare*". La mappa polare è una rappresentazione bidimensionale della distribuzione tridimensionale del radiofarmaco nel cuore, la cui porzione centrale corrisponde all'apice, mentre la porzione più esterna corrisponde alla base del ventricolo sinistro [75-77].



**Figura 8.** Metodologia per l'analisi quantitativa delle immagini PET cardiache e genesi di una mappa polare.

Da *Burckhardt D D 2009 e Lin G S 2006*

Le superfici epicardiche ed endocardiche sono anche utili per elaborare rappresentazioni tridimensionali della perfusione miocardica, visualizzate con una mappa a colori o come una struttura "a rete". La distribuzione regionale del radiotracciante (parete anteriore, posteriore, laterale, setto ed apice) può essere espressa in MBq/ml, SUV o in unità di deviazione standard rispetto al valore medio di attività miocardica. Attualmente in letteratura non esistono linee guida che stabiliscano un valore-soglia normale di perfusione miocardica per la determinazione dell'estensione dell'area d'infarto. Molti algoritmi si basano sullo sviluppo e sulla validazione di un *database* normale su soggetti sani, oppure sui risultati ottenuti con fantocci antropomorfi o rappresentano tutti i valori di perfusione inferiori al 50% del valore massimo di attività miocardica come anormali [76-78]. Generalmente le mappe polari sono normalizzate per il massimo valore di attività miocardica, adottando una scala da 0 alla massima attività, pari al 100%. Pertanto, i difetti di perfusione del miocardio vengono comunemente espressi in valore percentuale, contando il numero di pixel nella

mappa polare la cui attività è considerata inferiore alla norma, e rapportandolo al numero totale di pixel. Metodi alternativi prevedono la determinazione nella mappa polare del valore di deviazione standard per i pixel con attività inferiore alla norma, oppure la misurazione dell'estensione della regione ipoperfusa in  $\text{cm}^2$ , essendo note le dimensioni dei singoli pixel [76-77]. I pixel oscurati nella mappa polare rappresentano visivamente il difetto di perfusione miocardico. In letteratura la valutazione della perfusione e della vitalità miocardica mediante PET è riportata anche nei roditori da laboratorio, con l'ausilio di software automatici proprietari [79-80], clinici (Scion Image, ImageJ) [78-81] o dedicati (Munich Heart) [52-53-65]. La validazione dei metodi di analisi quantitativa PET sviluppati per i piccoli roditori di laboratorio è stata realizzata utilizzando come *gold standard* l'istomorfometria [53-65-81] o l'autoradiografia [78-79]. Il valore-soglia di perfusione miocardica normale per misurare accuratamente l'estensione dell'area infartuata è stato determinato e validato nel topo per comparazione con le misurazioni istologiche [65], oppure stabilendo, sulla base del metodo descritto da O'Conner et al. nel 1990 [78-82], che i pixel con valore inferiore al 50% della massima attività miocardica rappresentano aree di ipoperfusione [52-53-78-81].

## **BASE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E SCOPO DEL LAVORO**

La PET cardiaca con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG è largamente impiegata per identificare nei pazienti infartuati le aree di miocardio vitale residuo (*stunned, hibernating myocardium*), caratterizzato da disfunzione contrattile reversibile, le cui cellule sono ancora in grado di metabolizzare il glucosio, con importanti implicazioni prognostiche e terapeutiche [83]. Nell'uomo la quantificazione dell'estensione dell'area d'infarto mediante PET è stata accuratamente standardizzata e la misurazione di questo parametro è un importante obiettivo clinico per formulare una prognosi corretta e ottimizzare le scelte terapeutiche. Nella ricerca cardiovascolare preclinica, la PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG offre l'indubbio vantaggio di valutare in maniera accurata il metabolismo glucidico e l'estensione dell'area di necrosi miocardica, monitorando uno stesso soggetto nel tempo ed in maniera non invasiva. Sebbene la quantificazione dell'estensione dell'infarto nel topo risulti più complessa a causa delle ridotte dimensioni e per l'elevata frequenza del battito cardiaco, la sua determinazione mediante acquisizioni PET seriali rappresenta attualmente uno strumento utile per testare l'efficacia di trattamenti innovativi come la terapia genica o con cellule staminali. Negli ultimi anni, inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la progressione dell'infarto miocardico verso lo scompenso cardiaco è associata ad alterazioni metaboliche e trascrizionali, quali il viraggio dalla prevalente ossidazione degli acidi grassi alla ossidazione del glucosio e la variazione della sintesi di vari enzimi, tra cui l'*Uncoupling Protein 3* (UCP3), che disaccoppia la fosforilazione ossidativa dell'ADP. Queste proteine sono coinvolte nell'evoluzione dell'insufficienza cardiaca e rappresentano pertanto potenziali bersagli terapeutici nella cardiomiopatia ischemica. In tale ambito, i modelli murini geneticamente modificati rappresentano preziosi

strumenti per valutare *in vivo* il ruolo di specifiche sequenze geniche nella regolazione del metabolismo miocardico in condizioni patologiche.

Il principale scopo di questo studio è rappresentato dalla valutazione delle potenzialità applicative della PET/TC con [<sup>18</sup>F]-FDG nei modelli murini di infarto miocardico, in particolare per effettuare un'accurata valutazione qualitativa e quantitativa dell'estensione dell'area miocardica infartuata e del processo di rimodellamento ventricolare. Inoltre, la metodologia standardizzata è stata applicata all'analisi di un modello murino geneticamente modificato, per studiare a livello molecolare le alterazioni del metabolismo energetico associate all'infarto miocardico ed allo scompenso cardiaco in topi *wild type* e *knockout* per il gene UCP3.

## **MATERIALI E METODI**

### **§ Modello murino di infarto del miocardio**

Per questo studio sono stati esaminati mediante PET/TC con [<sup>18</sup>F]-FDG 40 topi, di età compresa tra 9 e 16 settimane, del ceppo inbred C57Bl/6J *wild type* e con background genetico misto C57/129S *knockout* per il gene UCP3. I topi *knockout* sono stati ottenuti generando delle *chimere* mediante microiniezione di cellule embrionali staminali (ES) del ceppo *inbred* 129SvJ agouti in blastocisti del ceppo C57Bl/6J, e proseguendo con l'*intercross* delle chimere e del ceppo ospite ed il *backcross* degli individui della generazione F1 eterozigoti *knockout*, in modo da ottenere in F2 individui omozigoti *knockout* per il gene UCP3. Il ceppo 129SvJ è noto per fornire con relativa facilità cellule embrionali staminali per realizzare esperimenti di “*gene targeting*” [84-85], ma non può essere convenientemente impiegato come ceppo ospite per le blastocisti a causa di problemi riproduttivi, immunologici e comportamentali [86]. I topi sono stati suddivisi in un gruppo di controllo, costituito da 20 soggetti

giudicati sani all'esame obiettivo generale ed un gruppo di 20 soggetti infartuati. L'infarto del miocardio è stato indotto chirurgicamente, mediante legatura permanente dell'arteria coronaria sinistra. Gli animali sono stati sottoposti ad esame PET/TC secondo il seguente schema:

Numerosità del campione	Gruppo sperimentale
20	controllo
6	1 giorno post infarto
2	1 settimana post-infarto
2	2 settimane post-infarto
10	4 settimane post-infarto

I risultati degli esami PET/TC con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG del gruppo di controllo sono stati elaborati per la creazione di un *database* normale di riferimento, in relazione allo specifico tracciante e protocollo sperimentale, mediante una valutazione qualitativa e quantitativa del metabolismo del glucosio a livello miocardico. I topi infartuati sono stati sottoposti ad esame PET/TC con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG ad 1 giorno, 1, 2 e 4 settimane di distanza dall'induzione dell'infarto miocardico, per effettuare la valutazione qualitativa e quantitativa dell'estensione dell'area infartuata e per monitorare il rimodellamento del ventricolo sinistro nella progressione dello scompenso cardiaco. Sei topi sono stati esaminati a due tempi, monitorando nello stesso soggetto le modificazioni nel tempo del metabolismo glucidico e dell'estensione dell'infarto miocardico, secondo il seguente schema:

Identità del topo	Tempo_I	Tempo_II
FF1R	controllo	4 settimane post-infarto
MI2R	controllo	4 settimane post-infarto
FM2L	1 giorno post infarto	4 settimane post-infarto
FM2N	1 giorno post infarto	4 settimane post-infarto
224	1 settimana post-infarto	4 settimane post-infarto
231	2 settimane post-infarto	4 settimane post-infarto

## § Preparazione del topo per studi PET/TC cardiaci

Le procedure operative e l'anestesia adottate per gli studi di imaging sono state ottimizzate sulla base delle indicazioni riportate in letteratura in merito all'impatto del contenimento e della preparazione del topo sulla qualità delle immagini PET con [<sup>18</sup>F]-FDG. La standardizzazione del protocollo operativo è finalizzata a bilanciare l'esigenza di ottenere immagini di buona qualità, di assicurare un buon tasso di sopravvivenza dei soggetti infartuati per monitorarli nel tempo e di minimizzare i fattori che possono inficiare i risultati sperimentali.

Nonostante il digiuno rappresenti nell'uomo un modo efficace di uniformare i risultati PET nell'imaging con [<sup>18</sup>F]-FDG, riducendo il tasso plasmatico di glucosio, a livello miocardico esso riduce il consumo di glucosio a favore dell'utilizzo degli acidi grassi. Inoltre, un digiuno prolungato (<6 ore) può indurre nel topo perdita di peso, disidratazione ed ipoglicemia, incrementando il rischio anestesiológico. Pertanto in questo studio i topi non sono stati tenuti a digiuno prima degli esami PET.

Poiché alcuni autori riportano che la temperatura influenza la biodistribuzione del [<sup>18</sup>F]-FDG in vari tessuti ed organi, e l'ipotermia ne aumenta significativamente la captazione a livello del grasso bruno interscapolare, i topi sono stati riscaldati con una

lampada ad infrarossi circa 15 minuti prima di ricevere il bolo endovenoso di radiofarmaco e durante la biodistribuzione. La normotermia è stata assicurata in modo analogo nel corso dell'acquisizione PET. Lo stress acuto derivante dal trasporto, dal contenimento e da ripetute iniezioni determina il rilascio in circolo di catecolamine e corticosterone, che innalzano rapidamente i livelli plasmatici di glucosio, la frequenza cardiaca, il dosaggio di anestetici necessario per un'adeguata immobilizzazione ed inducono ipertermia. Tutti questi fattori possono influenzare negativamente la biodistribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, interferendo con una ottimale visualizzazione del cuore. Pertanto, è stata prestata particolare attenzione ad un'appropriata manipolazione dei topi e prima della iniezione endovenosa di radiofarmaco ed intraperitoneale di anestetico è stata effettuata l'induzione con miscela di isoflurano 4% e 1Lt/min  $\text{O}_2$ , anche in considerazione del particolare stato patologico degli animali. Questa prassi sortisce un effetto vantaggioso sulla qualità delle immagini PET cardiache anche in virtù dell'effetto vasodilatatorio sulle arterie coronarie esplicito dall'isoflurano. Alcuni anestetici influenzano significativamente il metabolismo del glucosio nel topo e dunque i risultati degli studi PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG. Ad esempio la xylazina,  $\alpha$  agonista sedativo, utilizzato comunemente in associazione con la chetamina, riduce significativamente i livelli plasmatici di insulina e dunque innalza la glicemia e l'attività dell' [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nel sangue, riducendone la captazione in vari organi. L'isoflurano, invece, innalza solo leggermente la glicemia. Nel corso del nostro studio, non disponendo di un sistema di anestesia gassosa connesso all'apparecchiatura PET/TC, abbiamo optato per il *mouse cocktail* ketamina 100 mg/kg + 10 mg/kg xylazina, in quanto è risultato adatto ad assicurare alcune esigenze fondamentali, quali un'adeguata immobilizzazione per circa 45 minuti, reversibilità a fine esame mediante somministrazione intraperitoneale di atipamezolo 1 mg/kg ed ampio margine di

sicurezza. Nessun soggetto è deceduto in conseguenza dell'anestesia e, nonostante sia riportato in letteratura che la xylazina induca ridotta captazione cardiaca di FDG per l'effetto iperglicemizzante, la visualizzazione del miocardio è risultata soddisfacente.

In letteratura è descritto che l'incremento della captazione miocardica di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG può essere ottenuto sia in campo clinico che preclinico mediante la somministrazione di insulina e carico di glucosio, trenta minuti prima della iniezione endovenosa di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG. In questo studio tale procedura non è stata integrata nella preparazione dei topi all'esame PET, in quanto avrebbe potuto confondere imprevedibilmente i risultati sperimentali. Infatti, l'obiettivo principale di questo progetto di ricerca è indagare le alterazioni del metabolismo energetico miocardico legate all'espressione del gene che codifica per l'enzima *Uncoupling Protein 3* (UCP3); inoltre il *background* genetico C57BL dei topi impiegati è associato ad un'insita predisposizione all'iperglicemia ed al diabete mellito.

## **§ PET/TC imaging del cuore**

Per eseguire l'esame PET, il [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG è stato iniettato in bolo nella vena laterale della coda con una siringa priva di volume morto, munita di ago 30 Gauge, per un volume massimo di 100 $\mu\text{L}$  ed un'attività compresa tra 200 e 230  $\mu\text{Ci}$ . L'attenzione al volume dell'iniettato è stata dettata sia dalla raccomandazione generale di non superare nel topo il limite di 200  $\mu\text{l}$  nella somministrazione endovenosa, scongiurando il rischio di ipervolemia ed edema polmonare, ma anche dalla esigenza di minimizzare i problemi legati all'"effetto massa" (relazione tra la riduzione dell'attività specifica del tracciante col decadimento radioattivo e l'incremento del numero di molecole iniettate) e dunque ai possibili effetti farmacologici del tracciante. Questo problema è più significativo nel topo rispetto all'uomo, perché in relazione al peso corporeo, nel primo si inietta una quantità

maggiore di radiofarmaco (circa 50 volte superiore a quella di un essere umano) per garantire un'adeguata qualità dell'immagine. L'esame PET è stato avviato a circa 40 minuti dall'iniezione di [<sup>18</sup>F]-FDG. Appena raggiunta una profondità adeguata dell'anestesia (assenza di movimenti spontanei, riflesso podale ridotto o assente), ciascun soggetto è stato simmetricamente posizionato su supporto cartaceo monouso preriscaldato con l'ausilio di *surgical tape* ed è stato applicato un lubrificante oculare per prevenire ulcere corneali. Infine il soggetto è stato posizionato sul lettino della PET/TC, avendo cura di disporre il cuore al centro del FOV. Durante l'esame PET/TC la normotermia è stata assicurata con una lampada ad infrarossi. Per ciascun soggetto è stata eseguita una acquisizione PET statica, seguita da una scansione TC, con campo di vista esteso dal muso al diaframma. L'acquisizione PET/TC "*one bed position*" è funzionale a diversi scopi, ad esempio evitare l'interferenza della vescica, in cui si concentra il radiofarmaco in conseguenza dell'escrezione renale, e limitare i tempi di acquisizione, riducendo così il rischio anestesiológico per gli animali. Ciascun esame ha richiesto complessivamente circa 45 minuti (30 minuti PET/ 10 minuti TC). In questo studio è stato impiegato uno scanner PET/TC dedicato per piccoli roditori da laboratorio (eXplore Vista GE Healthcare), caratterizzato da un'apertura del gantry di 8 cm, un campo di vista assiale di 4.8 cm e transassiale di 6.7 cm, con risoluzione spaziale in modalità PET pari a 1.6 mm FWHM e 200 µm in modalità TC. Questo scanner si distingue per la particolare struttura dei 36 detettori, costituiti da due tipi di cristalli scintillatori 145x145x7mm (anteriormente lutezio ittrio ortosilicato, LYSO, e posteriormente gadolinio ortosilicato, GSO, attivati al cerio) assemblati in associazione a fotomoltiplicatori. Questa particolare struttura consente di stabilire il sito di interazione dei raggi gamma con i cristalli e compensare l'errore di parallasse, che degrada progressivamente la risoluzione spaziale con l'incremento della distanza dal centro del FOV. Le immagini PET sono state ricostruite applicando l'algoritmo definito "*2D FORE (Fourier rebinning) 3D OSEM*

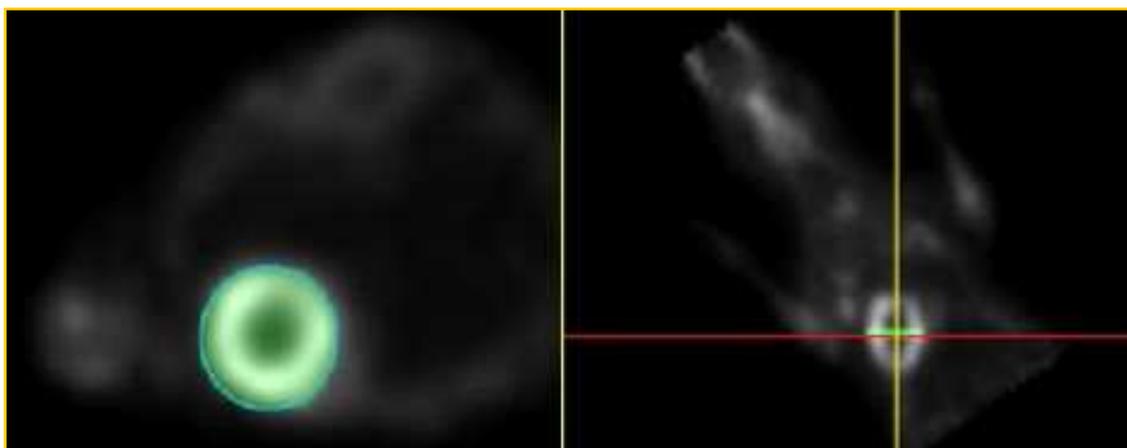
(*ordered subset expectation maximization*)” per produrre 61 sinogrammi bidimensionali nel piano assiale, a partire dai quali generare le immagini tridimensionali (voxels con dimensione  $0.3875 \times 0.3875 \times 0.7750 \text{ mm}^3$ ), includendo la correzione per random e scatter. Questo algoritmo “*resolution recovery*” consente di migliorare la qualità delle immagini del 30%, riducendo sostanzialmente le variazioni in risoluzione spaziale attraverso il campo di vista [87].

### **§ Post processing delle immagini PET/TC cardiache**

Il database PET è stato sottoposto ad un’analisi qualitativa e semiquantitativa con l’ausilio del software proprietario dello scanner PET/TC eXplore Vista, quantificando il consumo di glucosio a livello miocardico, nei topi normali ed infartuati, in MBq/ml ed in SUV units. Il SUV è un indicatore adimensionale, diffusamente impiegato per esprimere la captazione di FDG a livello tissutale, secondo la formula:

$$\text{SUV} = \frac{\text{radioattività nella regione d'interesse (MBq/ml)} \times \text{peso corporeo (g)}}{\text{dose di radiofarmaco iniettata (MBq)}}$$

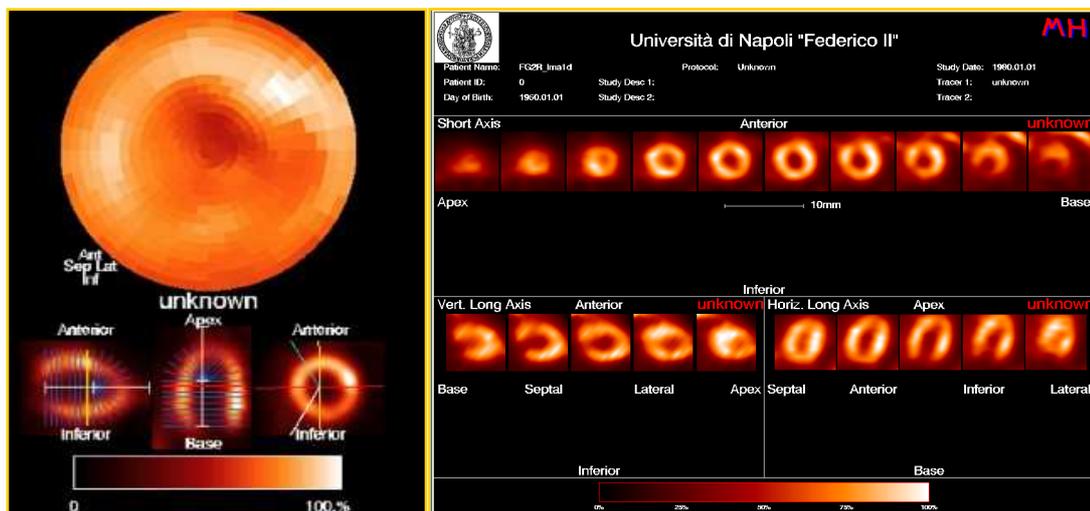
Il SUV rappresenta un conteggio normalizzato per il peso corporeo e per la dose somministrata, e pertanto consente di comparare studi PET tra diversi soggetti eseguiti in differenti condizioni sperimentali. L’analisi semiquantitativa con il software proprietario dello scanner PET/TC eXplore Vista ha richiesto innanzitutto la ricostruzione delle immagini PET in MBq/ml ed in SUV, successivamente riorientate secondo l’asse longitudinale del cuore, in modo da ottenere sezioni simmetriche del ventricolo sinistro in asse corto. Procedendo dalla base all’apice, il ventricolo sinistro dei topi è risultato compreso mediamente in 7 sezioni assiali, e la mediana è stata scelta come tomogramma rappresentativo per calcolare, su una ROI (*region of interest*) circolare, il cui perimetro ricalca intimamente il profilo epicardico, il valore medio di MBq/ml e SUV [88] (*vedi Figura 9*).



**Figura 9.** Analisi semiquantitativa con il software eXplore Vista PET/TC

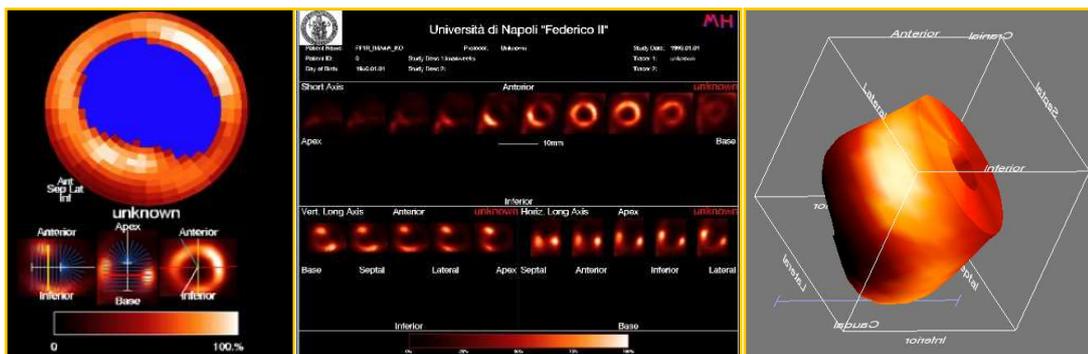
Il software “Munich Heart” è stato invece impiegato per generare mappe polari, utilizzate per quantificare nei soggetti normali la distribuzione regionale del radiofarmaco a livello delle pareti anteriore, laterale, posteriore, del setto e dell’apice del ventricolo sinistro in valore percentuale ed in SUV (vedi Figura 10). Inoltre, è stato possibile, con l’ausilio di speciali funzioni del software, misurare l’area di superficie totale ( $\text{mm}^2$ ) ed il volume ( $\mu\text{l}$ ) del ventricolo sinistro. Nei soggetti infartuati è stata valutata l’estensione dell’area di necrosi in  $\text{cm}^2$  ed in percentuale dell’intera superficie del ventricolo sinistro. L’algoritmo analitico impiegato in questo studio è stato adattato ed ottimizzato per l’analisi quantitativa dei dati PET del cuore nei roditori da laboratorio. Questo studio ha rappresentato la sua prima applicazione nella specie murina e dunque l’occasione per standardizzare la procedura d’analisi con mappa polare nel topo e verificare la riproducibilità intra- ed inter-operatore della metodica. Analogamente ai software utilizzati in campo clinico, l’algoritmo del MH si articola in alcuni punti fondamentali, quali la definizione manuale dell’asse longitudinale del cuore su una sezione trans-assiale mediana e parasagittale del ventricolo sinistro, del piano valvolare e della giunzione inferiore tra ventricolo destro e sinistro. In tal modo, a partire da un dataset PET con  $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$  *non gated*, sono state generate automaticamente immagini in asse corto, asse lungo orizzontale e verticale del

ventricolo sinistro ed è stato effettuato un campionamento volumetrico della massima attività miocardica su un totale di 540 punti (36 in longitudinale, ogni 10°, e 15 in trasversale). La risultante mappa polare presenta, secondo la comune convenzione, la porzione centrale corrispondente all'apice, e quella più esterna alla base del ventricolo sinistro, con la parete anteriore orientata verso l'alto ed il setto verso sinistra [77]. I conteggi a livello miocardico possono essere espressi come “raw data” (dati grezzi) in SUV oppure possono essere normalizzati per il valore massimo di attività (pari alla media ricavata in una ROI costituita dai 6 settori con attività più elevata), corrispondente al 100%.



**Figura 10.** Analisi semiquantitativa con il software “Munich Heart”

La soglia adottata per discriminare tra miocardio vitale e *scar tissue* è stata fissata al 50% della massima attività di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, in accordo con quanto descritto e validato sia nell'uomo [77] che nel ratto [52] e nel topo con SPECT [78] e PET [79]. Questo programma infine ha consentito anche di realizzare mappe polari tridimensionali [88] (vedi Figura 11).



**Figura 11.** Quantificazione dell'area d'infarto e ricostruzione 3D del ventricolo sinistro con il software "Munich Heart"

## ANALISI STATISTICA DEI DATI

I risultati sperimentali sono stati espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard. In tutti i test effettuati è stato scelto un basso livello di significatività (0.01) a causa dell'esigua dimensione del campione. I valori medi della captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG in SUV a livello del ventricolo sinistro nei soggetti sani, calcolati con il software proprietario eXplore Vista e MH, sono stati comparati con il test di Wilcoxon, con intervallo di confidenza del 99%. I valori medi di captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello della parete anteriore, laterale, posteriore, del setto e dell'apice del ventricolo sinistro dei soggetti sani sono stati comparati con il test di Friedman, con intervallo di confidenza del 95%. I valori medi della captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello del ventricolo sinistro tra soggetti sani ed infartuati ed, in quest'ultimo gruppo, tra i due genotipi sono stati comparati mediante test di Wilcoxon. I valori medi di captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello del ventricolo sinistro dei soggetti infartuati appartenenti ai genotipi *wild type* e *knockout* per il gene UCP3 sono stati comparati mediante test di Wald eseguito sui coefficienti di un modello di regressione lineare. Analogamente, è stata comparata l'estensione dell'area d'infarto tra i due genotipi per evidenziare eventuali differenze statisticamente significative. La comparazione dei valori medi di captazione del

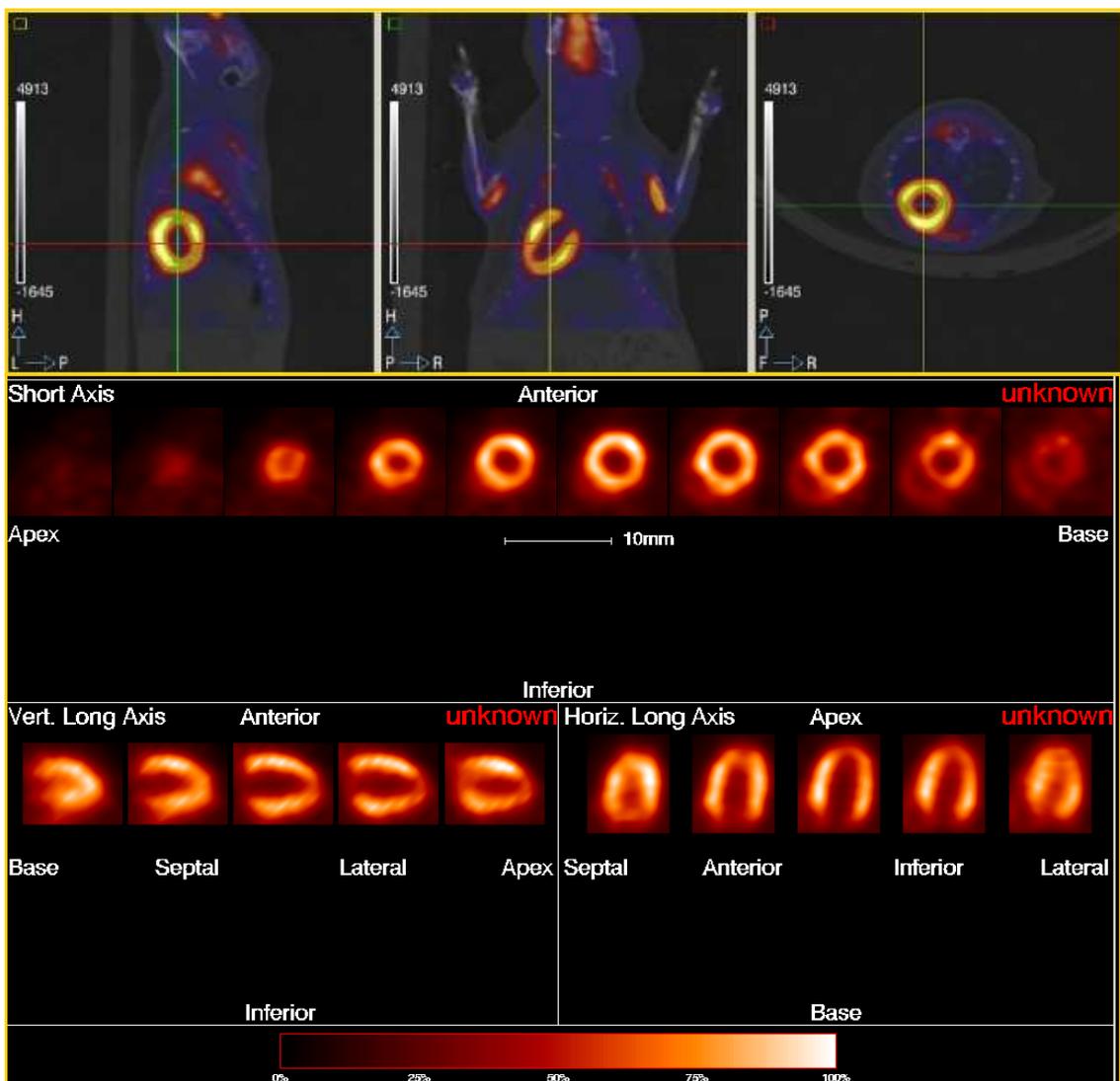
[<sup>18</sup>F]-FDG dei soggetti infartuati esaminati in due tempi successivi è stata effettuata mediante test di Wald eseguito sui coefficienti di un modello di regressione lineare. Un modello di regressione lineare è stato impiegato inoltre per saggiare eventuali differenze statisticamente significative rispetto all'area di superficie ed al volume del ventricolo sinistro tra soggetti sani ed infartuati. La riproducibilità intra- ed inter-osservatore delle procedure di post-processing per la misurazione dell'estensione dell'area infartuata è stata stimata calcolando il *repeatability coefficient* (RC), mentre la riproducibilità interpretativa intra- ed inter-osservatore è stata valutata mediante l'*interclass correlation coefficient* (ICC) con intervallo di confidenza del 95%. I risultati statistici sono stati interpretati assumendo che un valore di RC inferiore al doppio della deviazione standard delle differenze e di ICC superiore a 0.8 indicano un'eccellente riproducibilità.

## **RISULTATI**

### **§ Database normale**

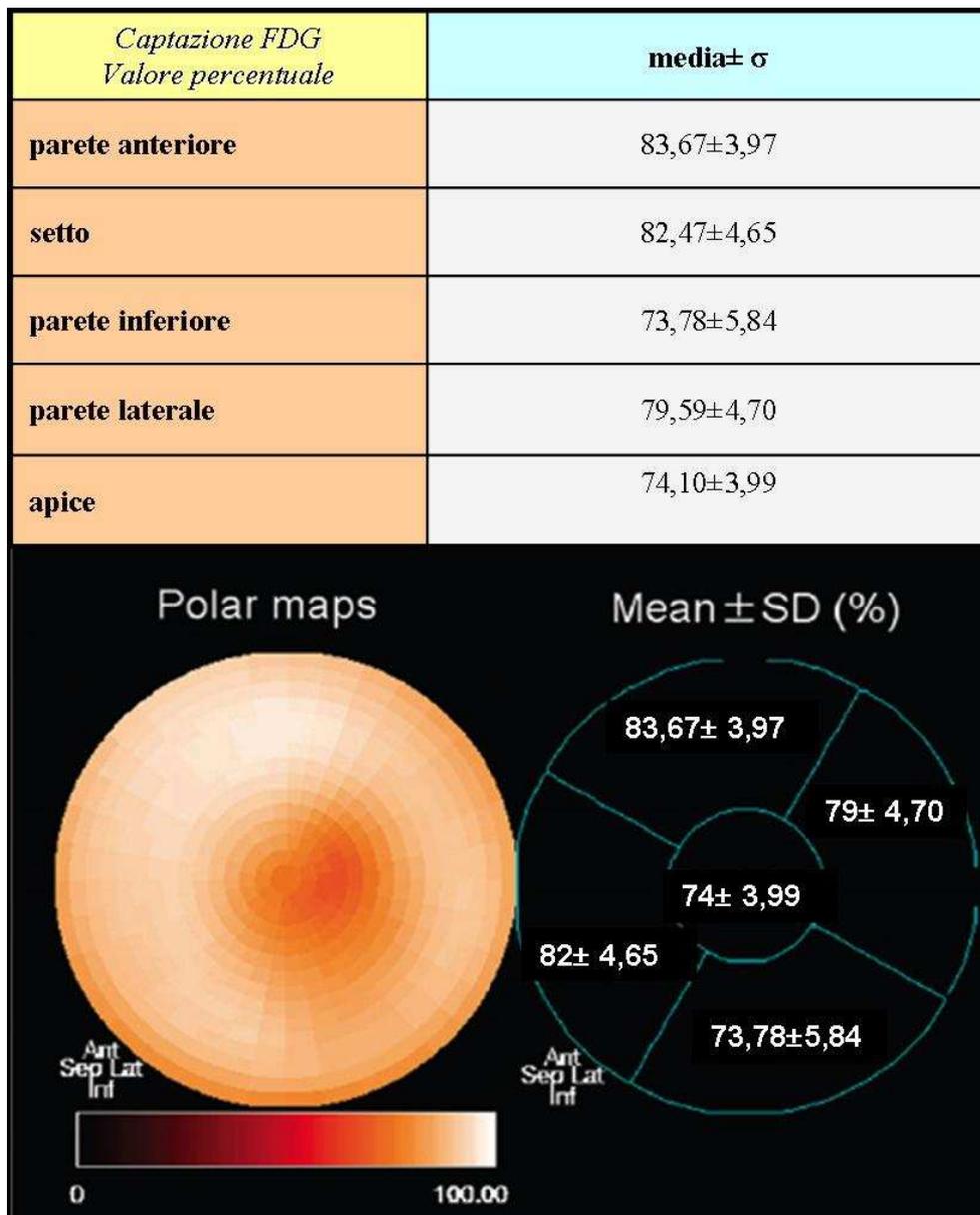
Il database normale comprende un numero statisticamente significativo (n=20) di soggetti non sottoposti a chirurgia e giudicati sani in base ad un esame obiettivo generale. Le immagini PET sono state analizzate qualitativamente per valutare l'aspetto e l'omogeneità della distribuzione del radiotracciante nel miocardio. Nei topi sani, il [<sup>18</sup>F]-FDG consente di visualizzare nettamente la parete miocardica del ventricolo sinistro, mentre la captazione a livello della parete ventricolare destra è meno costante e definita. Il ventricolo sinistro si estende prevalentemente alla sinistra del piano sagittale mediano ed occupa la porzione medio-caudale e ventrale del mediastino. Esso appare caratterizzato da una forma globalmente conica, sezione circolare in *short axis slice* ed approssimativamente triangolare in *horizontal* e *vertical long axis slices*. La parete

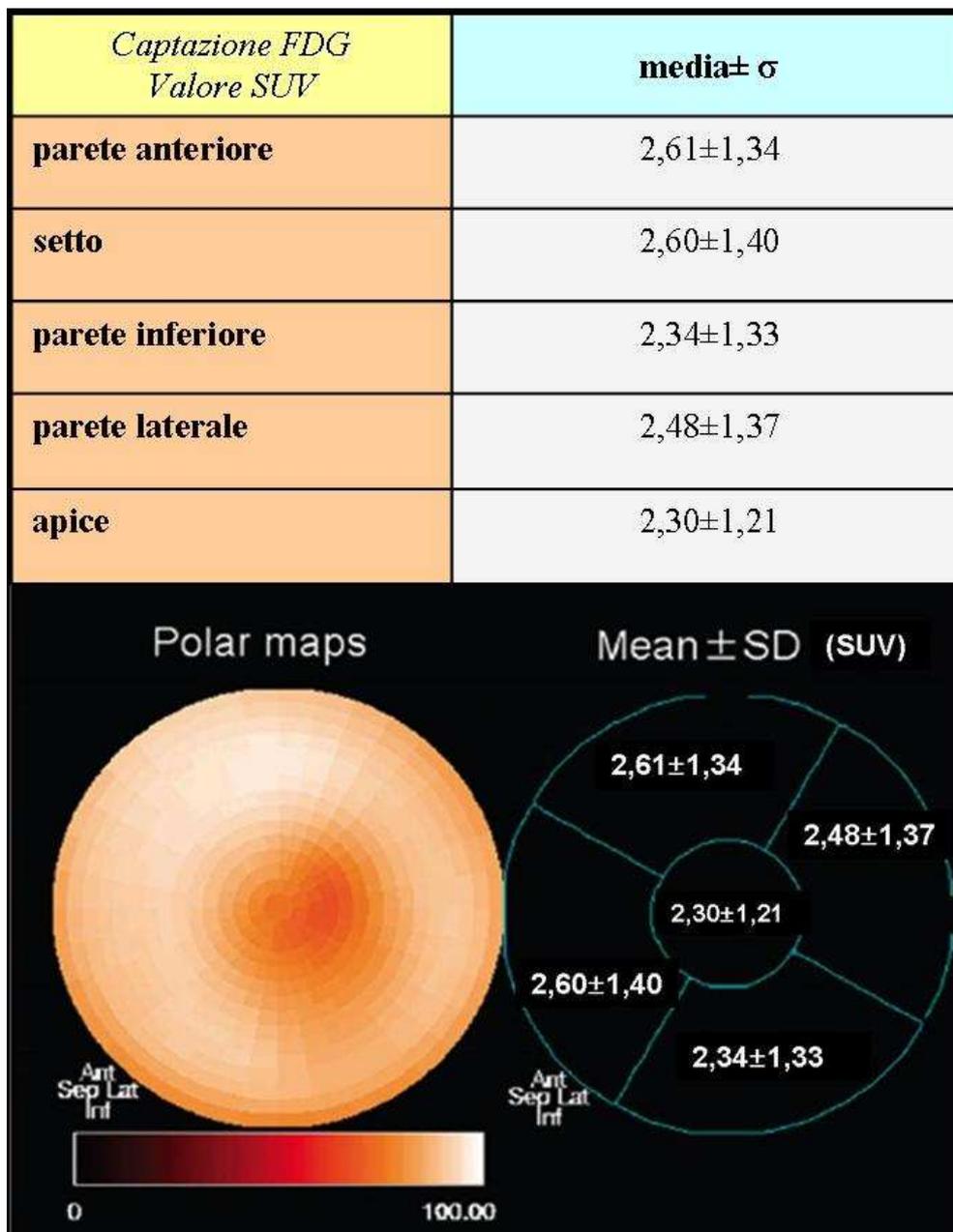
anteriore mostra un profilo lievemente convesso, adagiato sulla superficie sternale, mentre quello della parete posteriore appare più rettilineo. L'asse longitudinale è orientato in senso cranio-caudale, con la base rivolta verso la parete toracica destra e l'apice verso quella sinistra. Nell'uomo si osserva frequentemente una ridotta captazione del radiotracciante a livello della *pars membranacea septi*, mentre nel topo questo reperto non è evidente. Quando visibile, il ventricolo destro appare caratterizzato da una parete sottile, definita da una tenue captazione, e sezione assiale "a semiluna", in rapporto con la porzione medio-basale del setto interventricolare (vedi Figura 12).



**Figura 12.** Analisi qualitativa del ventricolo sinistro mediante PET/TC con [18F]-FDG in topo normale

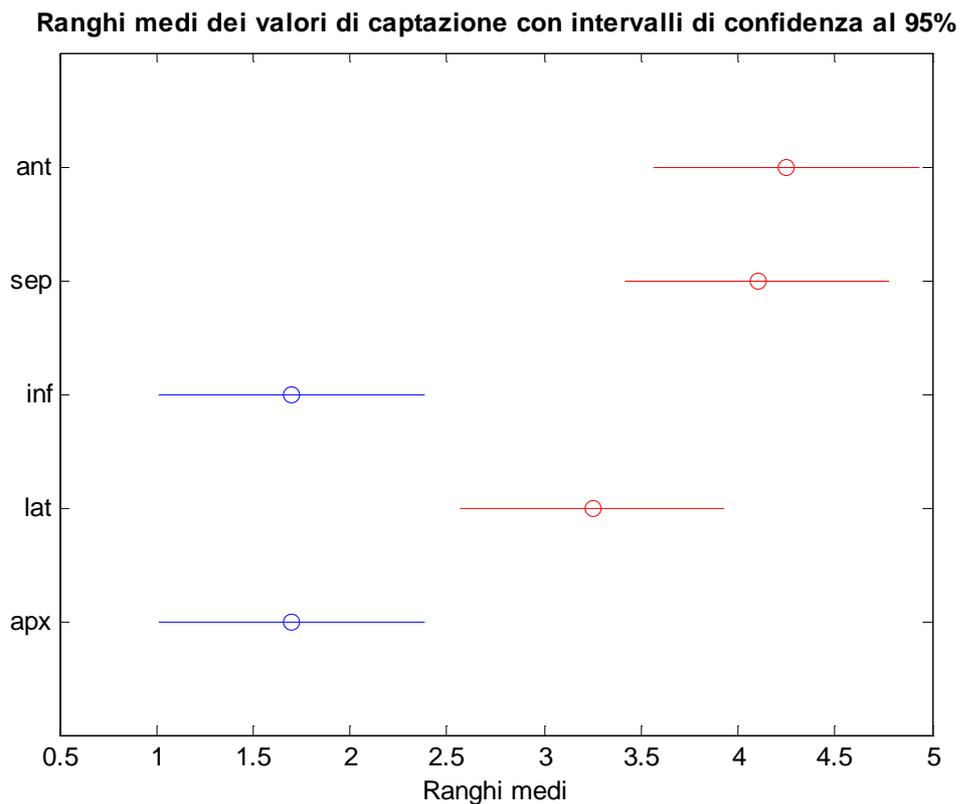
Parallelamente all'analisi visiva, è stato adottato un approccio semiquantitativo per valutare la distribuzione del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello del ventricolo sinistro. La captazione media in percentuale ed in SUV units, calcolata a livello delle pareti anteriore, laterale ed inferiore, del setto e dell'apice con il software MH, è risultata relativamente uniforme, anche se si osserva una captazione leggermente più bassa a livello della parete inferiore e, analogamente all'uomo ed al ratto, a livello apicale. Questo aspetto è verosimilmente legato ad un effetto di volume parziale nelle aree dove lo spessore miocardico è inferiore alla risoluzione spaziale e ad artefatti da movimento in immagini PET *non gated*.





I valori medi della captazione di [<sup>18</sup>F]-FDG a livello della parete anteriore, laterale, posteriore, del setto e dell'apice del ventricolo sinistro dei soggetti sani sono stati comparati con il test di Friedman, con correzione per confronti multipli. Il test fornisce  $p < 0.00001$ , evidenziando in linea generale una differenza statisticamente significativa tra i valori di captazione delle diverse regioni del miocardio ventricolare sinistro. Per definire in maniera specifica le differenze nei livelli di captazione di [<sup>18</sup>F]-FDG tra le pareti ventricolari, sono stati riportati su un grafico i ranghi dei valori di captazione per ognuna di esse, con intervallo di confidenza del 95%. L'apice e la

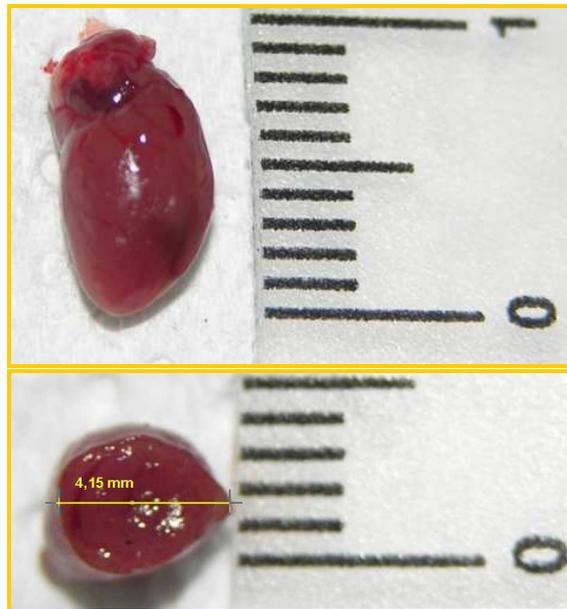
parete inferiore del ventricolo sinistro mostrano ranghi simili ed intervalli di confidenza sovrapponibili, pertanto tra esse non emerge una differenza statisticamente significativa del livello di captazione. Analogamente, le pareti anteriore, laterale e settale presentano ranghi comparabili, con intervalli di confidenza che si intersecano notevolmente, per cui è possibile affermare che tra esse non si evidenzia una differenza statisticamente significativa nella captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG. Le regioni del miocardio ventricolare così distinte (apice e parete inferiore *versus* parete anteriore, laterale e settale) mostrano tra loro ranghi diversi, senza intersezione tra gli intervalli di confidenza. I gruppi statisticamente equivalenti sono rappresentati nel grafico con lo stesso colore (vedi *Figura 13*).



**Figura 13.** Distribuzione regionale del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nel ventricolo sinistro

La captazione media di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello del ventricolo sinistro, calcolata mediante il software proprietario dello scanner PET/TC eXplore Vista in una ROI tracciata su una sezione assiale rappresentativa, è risultata pari a  $2.018 \pm 0.979$  SUV e  $0.505 \pm 0.235$  MBq/ml. La captazione media di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, calcolata con il software MH sull'intera mappa polare è risultata pari a  $2.470 \pm 1.33$  SUV. E' stato utilizzato il test di Wilcoxon con livello di significatività 0.01 per comparare le misure di captazione "globale" del ventricolo sinistro ricavate mediante i due software ed è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa ( $p=0.000008$ ) relativamente alle informazioni da essi fornite. E' plausibile interpretare questo risultato considerando che il software analitico dello scanner PET/TC eXplore Vista stima la captazione media di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG della struttura d'interesse su una ROI rappresentativa, individuata in questo caso nella sezione assiale mediana del ventricolo sinistro, analogamente alla metodologia comunemente adottata in campo oncologico, mentre il MH effettua una valutazione sull'intera mappa polare del ventricolo stesso, fornendo verosimilmente un dato meno approssimativo. Il valore minimo di captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello miocardico è risultato mediamente 49.04 %. Pertanto la soglia del 50% del valore massimo di captazione adottata in questo studio per discriminare tra miocardio vitale e infartuato, riportata in diversi lavori scientifici, è apparsa adeguata. Inoltre, Stegger et al. (2006) hanno riportato nel topo che, nonostante la migliore correlazione tra le misurazioni istologiche e PET dell'area d'infarto sia stata ottenuta adottando una soglia pari al 50% del valore massimo di captazione miocardica, tale valore rimane accettabile in un intervallo della soglia compreso tra 35-65% [79]. Con l'ausilio di particolari funzioni implementate nel software MH è stato possibile inoltre ricavare dalle mappe polari la misura dell'area di superficie totale e del volume del ventricolo sinistro, i cui

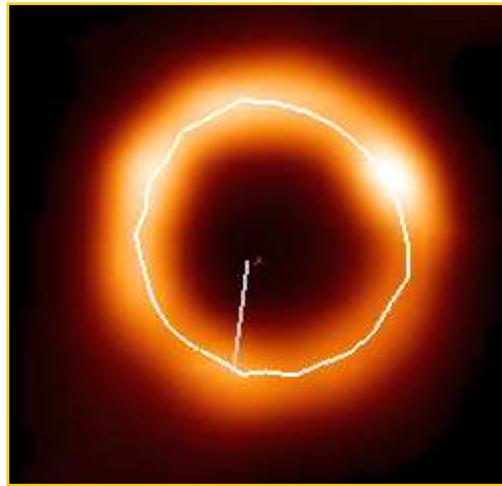
valori medi nei soggetti sani sono risultati rispettivamente  $72.37 \text{ mm}^2$  e  $56.62 \text{ }\mu\text{l}$  (vedi Figura 14).



**Figura 14.** Dimensioni del cuore del topo

La stima dell'area di superficie totale del ventricolo sinistro ricavata *in vivo* dall'analisi delle mappe polari, in base alle nostre conoscenze, non è stata ad oggi descritta in letteratura ed è risultata sovrapponibile ai valori ricavati da reperti anatomici *ex vivo* (area di superficie del ventricolo sinistro  $<100 \text{ mm}^2$  ; area di superficie atriale  $<35 \text{ mm}^2$ ) [89-90]. Le misure del volume tele diastolico (LVEDV) e telesistolico (LVESV) del ventricolo sinistro vengono generalmente effettuate mediante ecocardiografia o acquisizioni RM o PET con *gating* cardiaco e respiratorio [42]. Stegger et al. 2009 hanno riportato valori medi per il LVEDV pari a  $86 \pm 43 \mu\text{l}$  con PET e  $73 \pm 44 \mu\text{l}$  con RM, e per il LVESV pari a  $44 \pm 42 \mu\text{l}$  con PET e  $41 \pm 46 \mu\text{l}$  con RM. L'autore ha effettuato la stima del volume ventricolare su acquisizioni PET *gated* ed utilizzando l'"*endocardial contour*" come riferimento [42]. Nel nostro studio le acquisizioni PET non sono sincronizzate con l'attività cardiaca e l'algoritmo utilizza come riferimento per la stima del dato volumetrico il "*midmyocardial contour*" (l'area

della parete miocardica che delimita la cavità del ventricolo sinistro, equidistante dall'endocardio e dall'epicardio) (vedi Figura 15).

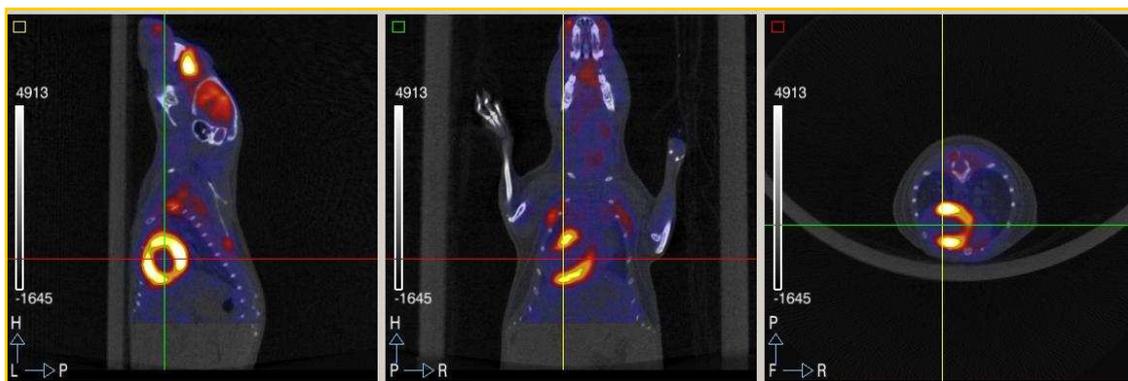


**Figura 15.** “Midmyocardial contour” in sezione assiale del ventricolo sinistro

Pertanto, essendo le acquisizioni PET statiche e *non gated*, il software ignora la contrazione ventricolare e, di conseguenza, i valori ottenuti non possono essere considerati una stima puntuale del volume ventricolare, ma piuttosto una stima indicativa delle dimensioni ventricolari [92].

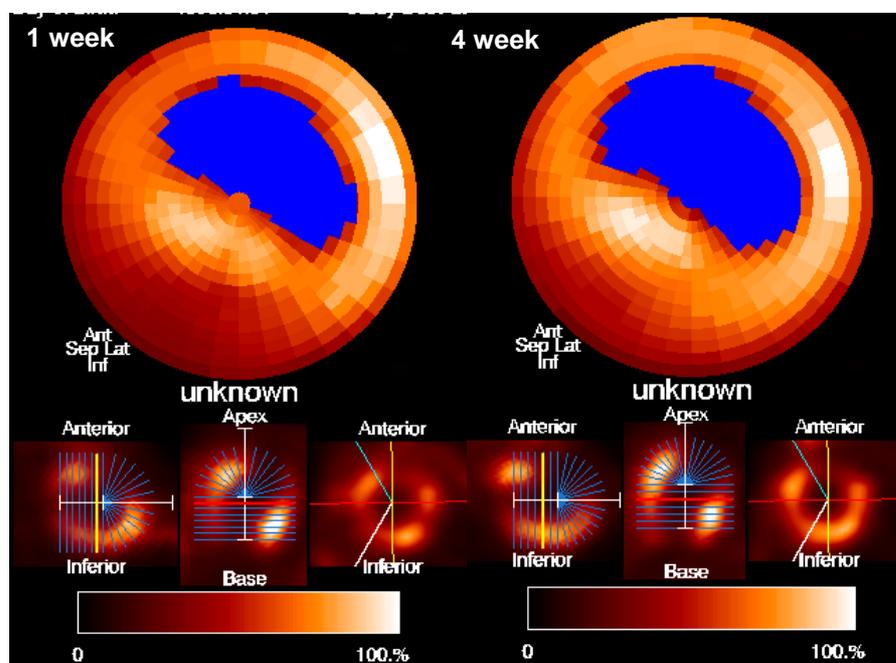
## **§ Analisi PET qualitativa e quantitativa dei soggetti infartuati**

La valutazione qualitativa delle immagini PET dei soggetti in cui è stata effettuata la legatura dell'arteria coronaria sinistra ha evidenziato tendenzialmente lo sviluppo di un infarto transmurale che interessa prevalentemente la parete antero-laterale e la porzione apicale del ventricolo sinistro (vedi Figura 16). Classicamente il territorio perfuso dalla *arteria coronaria discendente anteriore* nell'uomo comprende la parete anteriore ed i due terzi del setto del ventricolo sinistro. Le nostre osservazioni sono in accordo con i dati riportati in letteratura, evidenziando che la legatura della *arteria coronaria sinistra* nel topo determina in maniera costante l'infarto della parete libera del ventricolo sinistro, esteso all'apice, risparmiando il setto.



**Figura 16.** PET/TC con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG in modello murino di infarto del miocardio

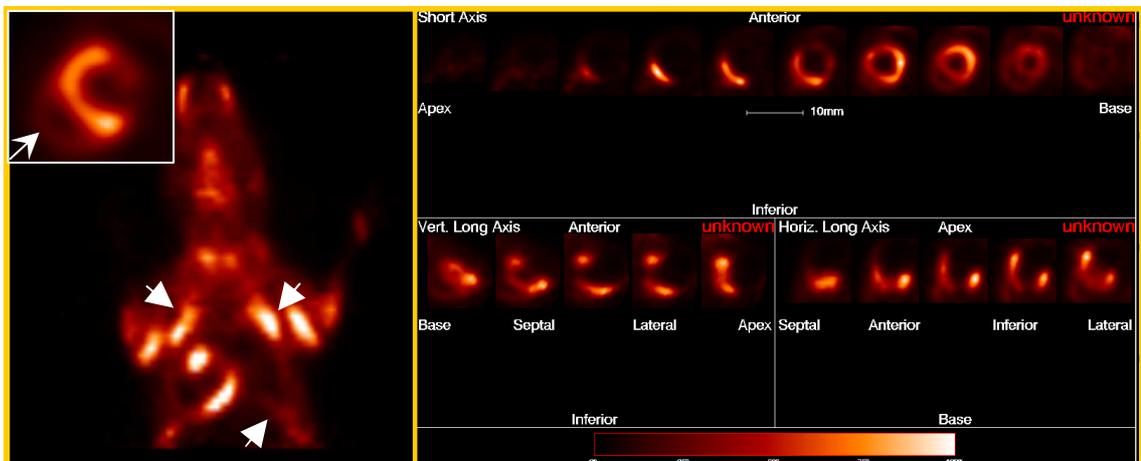
Soltanto in un soggetto abbiamo riscontrato ipocaptazione del setto basale (vedi *Figura 17*).



**Figura 17.** Infarto del miocardio della parete antero-laterale e dell'apice del ventricolo sinistro, con ipocaptazione del setto basale

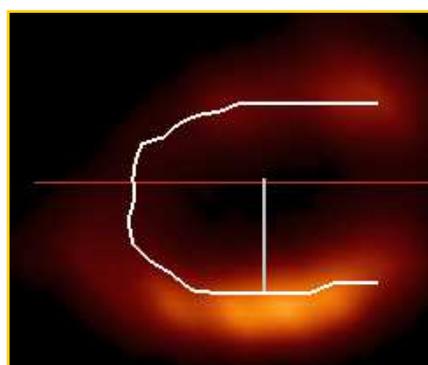
In seguito ad infarto miocardico si verifica il “rimodellamento” del ventricolo sinistro, con modificazioni nella forma e nelle dimensioni. L'ispezione visiva delle immagini PET rivela una considerevole dilatazione della cavità ventricolare nel caso di infarti molto estesi [79], che assume forma globosa e presenta pareti assottigliate. Nelle fasi avanzate dello scompenso cardiaco inoltre è possibile riscontrare anche la dilatazione del ventricolo destro ed una marcata captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello dei

muscoli respiratori intercostali e diaframma, segno di alterata dinamica ventilatoria (vedi Figura 18).



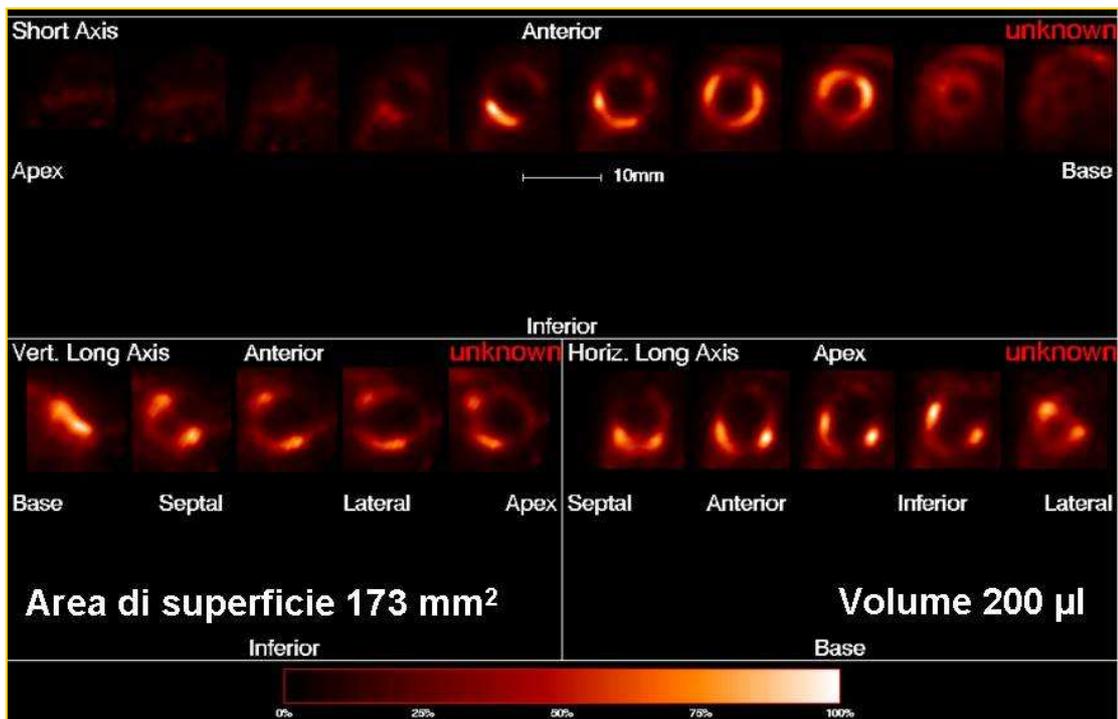
**Figura 18.** Dilatazione della cavità ventricolare in seguito ad infarto del miocardio e segni di alterata funzione respiratoria

In modo analogo ai soggetti sani, mediante il software MH è stato possibile ricavare dalle mappe polari la misura dell'area di superficie totale e del volume del ventricolo sinistro nei soggetti infartuati. Nei soggetti con infarto tuttavia, data la mancanza di captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nell'area necrotica, è importante verificare che il software effettui correttamente il processo di interpolazione per ricostruire il profilo miocardico completo, in particolare posizionando correttamente il punto di riferimento (*brush*) per il campionamento radiale del terzo inferiore e della regione apicale del ventricolo (vedi Figura 19).



**Figura 19.** Ricostruzione del profilo miocardico in ventricolo infartuato con il software Munich Heart

I valori medi sono risultati rispettivamente  $91.87 \text{ mm}^2$  e  $75 \mu\text{l}$ , direttamente proporzionali alla dilatazione del ventricolo sinistro apprezzabile visivamente. L'area di superficie ed il volume del ventricolo sinistro nei soggetti infartuati sono risultati superiori a quelli riportati per i soggetti sani, rispettivamente del 20.5% e 17.7% (vedi Figura 20).



**Figura 20.** Area di superficie e volume ventricolare in soggetto infartuato calcolati con il software Munich Heart

Per evidenziare eventuali differenze significative relativamente all'area di superficie ed al volume del ventricolo sinistro tra soggetti sani ed infartuati è stato impiegato un modello di regressione lineare. Il test di Wald ha evidenziato differenze statisticamente significative relativamente all'area di superficie ( $p 0.0034$ ), ma non per il volume ( $p 0.18$ ) del ventricolo sinistro tra gruppo di controllo ed infartuati. Questo risultato può essere interpretato in base all'assunto geometrico secondo cui in un solido (il ventricolo sinistro può essere schematicamente rappresentato come una struttura conica) le variazioni dell'area di superficie corrispondenti a quelle di volume non sono lineari. I valori medi della captazione di  $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$  a livello del ventricolo sinistro dei

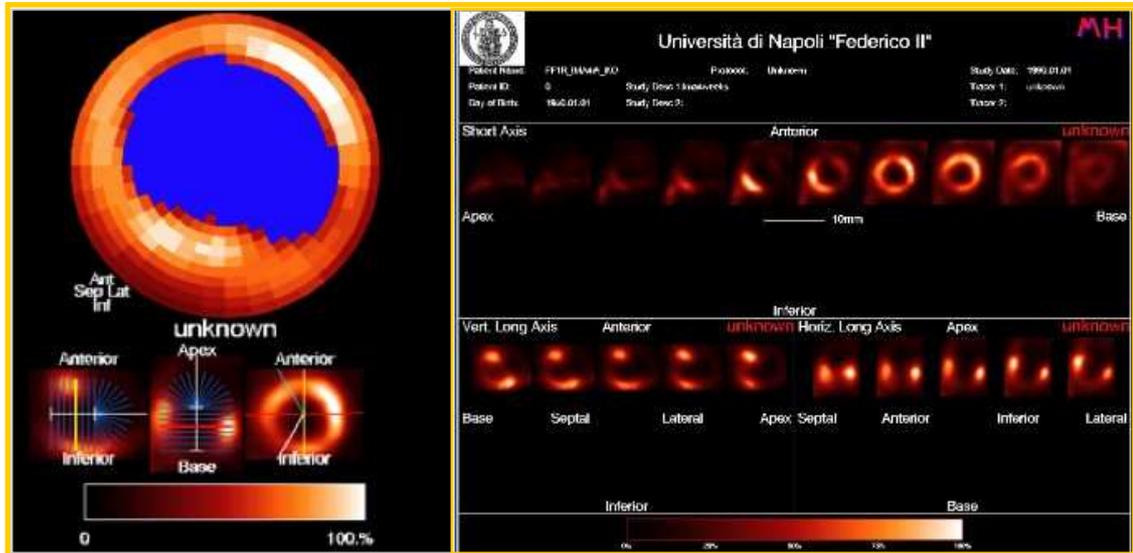
soggetti infartuati (nel complesso e separatamente in base al genotipo) sono stati calcolati con il software proprietario dello scanner PET/TC eXplore Vista su una sezione mediana rappresentativa in asse corto ed espressi in SUV units e MBq/ml. I risultati sono riassunti nelle seguenti tabelle :

	SUV (media $\pm$ $\sigma$ )
<b>topi infartuati (#20)</b>	3.05 $\pm$ 1.19
<b>topi infartuati <i>wild type</i> (#15)</b>	2.57 $\pm$ 0.73
<b>topi infartuati <i>knockout</i> (#5)</b>	4.48 $\pm$ 1.21

	MBq/ml (media $\pm$ $\sigma$ )
<b>topi infartuati (#20)</b>	0.84 $\pm$ 0.39
<b>topi infartuati <i>wild type</i> (#15)</b>	0.66 $\pm$ 0.38
<b>topi infartuati <i>knockout</i> (#5)</b>	1.12 $\pm$ 0.37

I valori medi di captazione del [<sup>18</sup>F]-FDG a livello del ventricolo sinistro dei soggetti sani ed infartuati sono stati comparati mediante test di Wilcoxon, che ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i due gruppi (SUV ctrl vs infartuati p value 0.0051; MBq/ml ctrl vs infartuati p value 0.0016). In particolare, confrontando i valori medi di captazione di [<sup>18</sup>F]-FDG del miocardio ventricolare dei soggetti sani con quelli dei soggetti infartuati distinti in base al genotipo, è emersa una differenza statisticamente significativa rispetto ai *knockout* (SUV ctrl vs infartuati KO p-value 0.0031; MBq/ml ctrl vs infartuati KO p-value 0.002) ma non rispetto ai *wilde type* (SUV ctrl vs infartuati WT p-value 0.066; MBq/ml ctrl vs infartuati WT p-value 0.14).

L'estensione dell'area dell'infarto miocardico è risultata compresa tra 0.001-0.874 cm<sup>2</sup> (media ±  $\sigma$ : 0.35 ± 0.22), corrispondente ad un intervallo tra 0.22 e 55% (media ±  $\sigma$ : 36.20 ± 13.06) dell'area della mappa polare (vedi Figura 21).



**Figura 21.** Misurazione dell'estensione dell'area d'infarto con il software Munich Heart

Per evidenziare eventuali significative variazioni dell'estensione dell'area infartuata nel tempo, i dati espressi in cm<sup>2</sup> o in valore percentuale della mappa polare sono stati esaminati con un modello di regressione lineare, in modo da valutare la relazione tra tempo ed estensione dell'area d'infarto. Il test di Wald non ha evidenziato modificazioni statisticamente significative dell'area infartuata nel tempo (area cm<sup>2</sup> p-value 0.52; area % p-value 0.34). Analogamente, per evidenziare eventuali significative variazioni dell'area di superficie e del volume del ventricolo sinistro dei soggetti infartuati nel tempo è stato adottato un modello di regressione lineare. Il test di Wald non ha evidenziato modificazioni statisticamente significative dell'area di superficie e del volume del ventricolo sinistro dei soggetti infartuati nel tempo (area di superficie mm<sup>2</sup> p-value 0.52; volume  $\mu$ l p-value 0.7). Infine, è stata valutata statisticamente la correlazione tra estensione dell'area d'infarto in cm<sup>2</sup> ed area di superficie e volume del ventricolo sinistro mediante un modello di regressione lineare. L'estensione dell'area d'infarto ha mostrato una correlazione positiva e significativa sia

rispetto all'area di superficie (coefficiente della regressione positivo,  $p < 0.0001$ ) che al volume del ventricolo sinistro (coefficiente della regressione positivo,  $p < 0.0001$ ).

## § Riproducibilità intra- ed inter-osservatore

Per questa analisi tutti gli studi PET sono stati esaminati due volte dallo stesso operatore (*riproducibilità intraosservatore*) ed interpretati da tre differenti osservatori (*riproducibilità interosservatore*). La riproducibilità intra- ed inter-osservatore delle procedure di post-processing e quella interpretativa sono risultate eccellenti come indicato dai valori di RC e ICCs riportati nelle tabelle:

<i>post-processing</i> <i>reproducibility</i>	area cm <sup>2</sup>	Intraobserver RC value	Interobserver RC value
Gruppo di controllo	0.01 ± 0.02	0.01	0.01
Gruppo infartuati	0.35 ± 0.22	0.12	0.16

<i>post-processing</i> <i>reproducibility</i>	area %	Intraobserver RC value	Interobserver RC value
Gruppo di controllo	1.62 ± 3.54	0.01	1.45
Gruppo infartuati	36.20 ± 13.06	0.71	5.01

<i>interpretative</i> <i>reproducibility</i>	Intraobserver ICC value	Interobserver ICC value	p value
Gruppo di controllo	0.89	0.54	< 0.01
Gruppo infartuati	0.95	0.82	< 0.01

## § Monitoraggio longitudinale mediante PET/TC dei soggetti infartuati

Per i topi esaminati in maniera seriale in due tempi è stato possibile effettuare una valutazione qualitativa delle variazioni in forma e dimensioni del ventricolo sinistro e nell'estensione dell'area d'infarto con l'evoluzione dall'infarto acuto (< 3 settimane) a quello cronico (4 settimane). La comparazione qualitativa delle immagini PET a tempi differenti mostra una sensibile e progressiva dilatazione della cavità ventricolare ed assottigliamento della porzione miocardica captante ai confini della regione infartuata (vedi Figura 22).

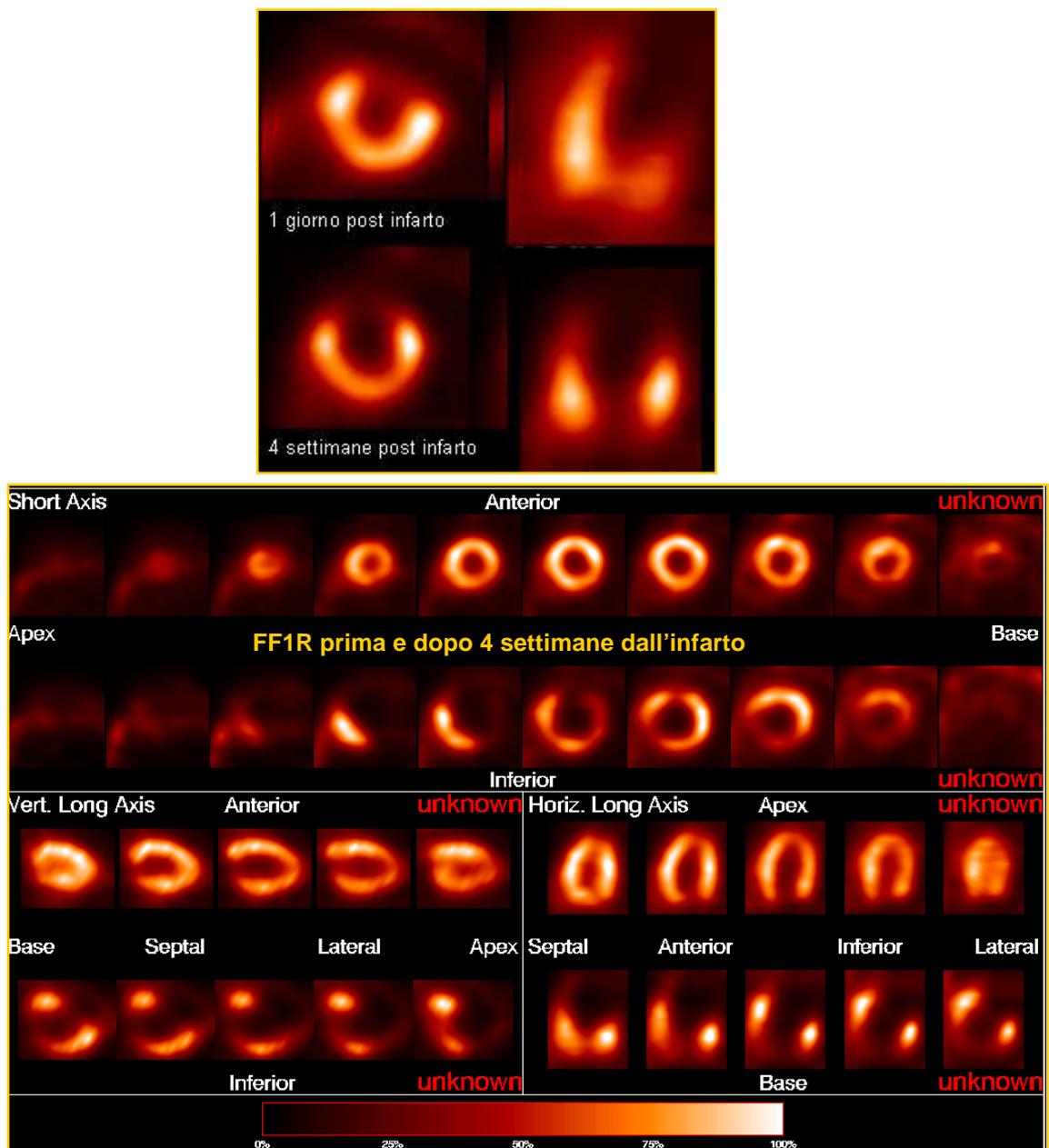


Figura 22. Monitoraggio longitudinale mediante PET/TC dei soggetti infartuati

Le mappe polari acquisite in due tempi per i 2 topi esaminati prima dell'induzione dell'infarto e a 4 settimane dall'evento ischemico sono state comparate per valutare i cambiamenti nella captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG a livello miocardico. La mappa polare della prima acquisizione è stata normalizzata per il valore massimo di attività miocardica (pari alla media ricavata in una ROI costituita dai 6 settori connessi, con attività più elevata), corrispondente al 100%. La mappa polare della seconda acquisizione PET è stata normalizzata in primo luogo "per referenza" rispetto alla prima (ossia normalizzando i valori di captazione di [ $^{18}\text{F}$ ] dei pixel di questa mappa polare per il valore massimo di attività miocardica registrato nella prima) ed in secondo luogo anch'essa per il proprio valore massimo di attività miocardica. La mappa polare corrispondente alla IV° settimana dall'infarto è stata dunque comparata con il "controllo di se stesso" facente parte del "database normale" relativo allo specifico tracciante e tipo di studio, ottenendo una terza mappa detta "differenziale". La stima della "differenza" dei conteggi piuttosto che del loro "rapporto" è preferibile, perché influenzata in quota minore da errori di misurazione (*vedi Figura 23*).

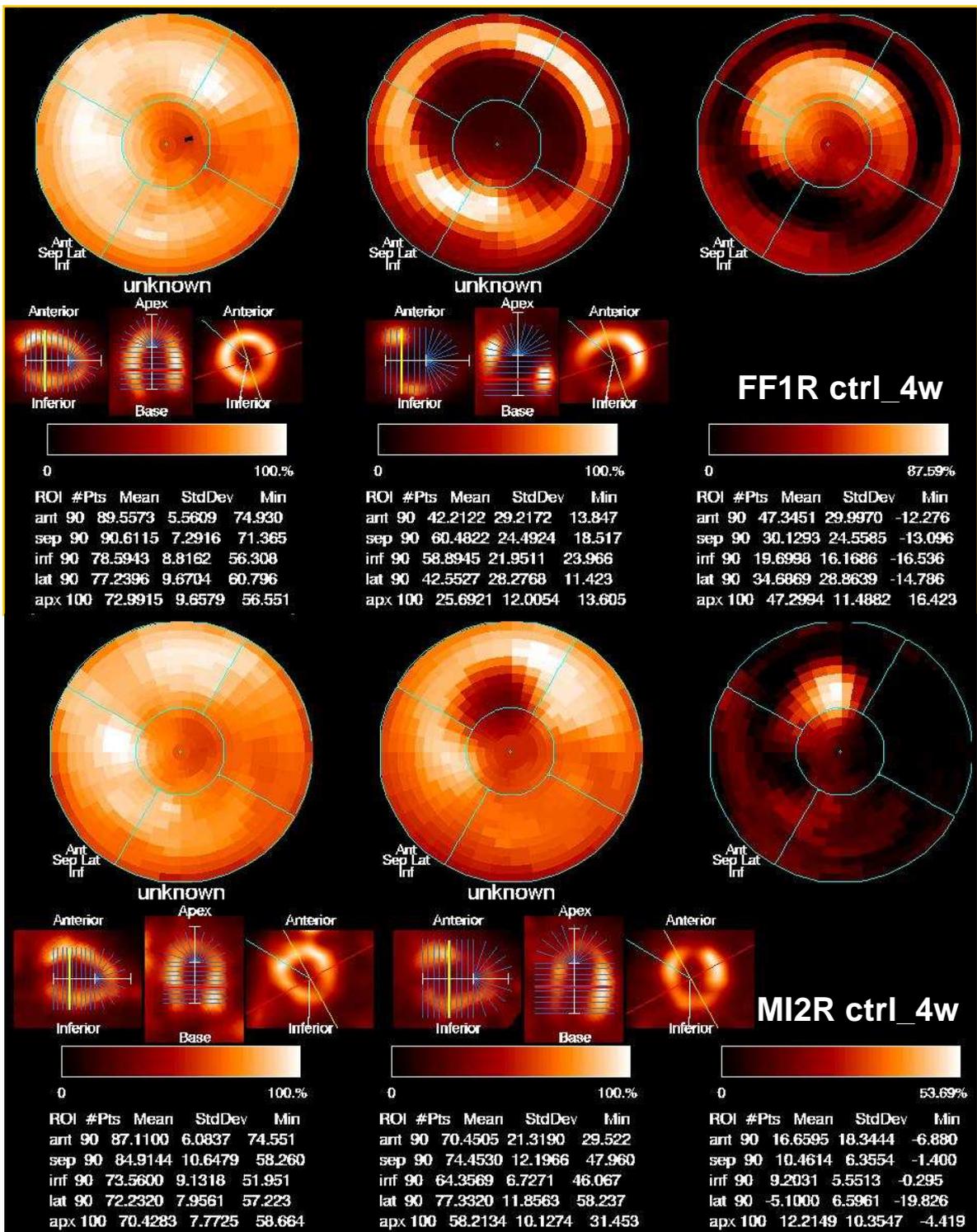
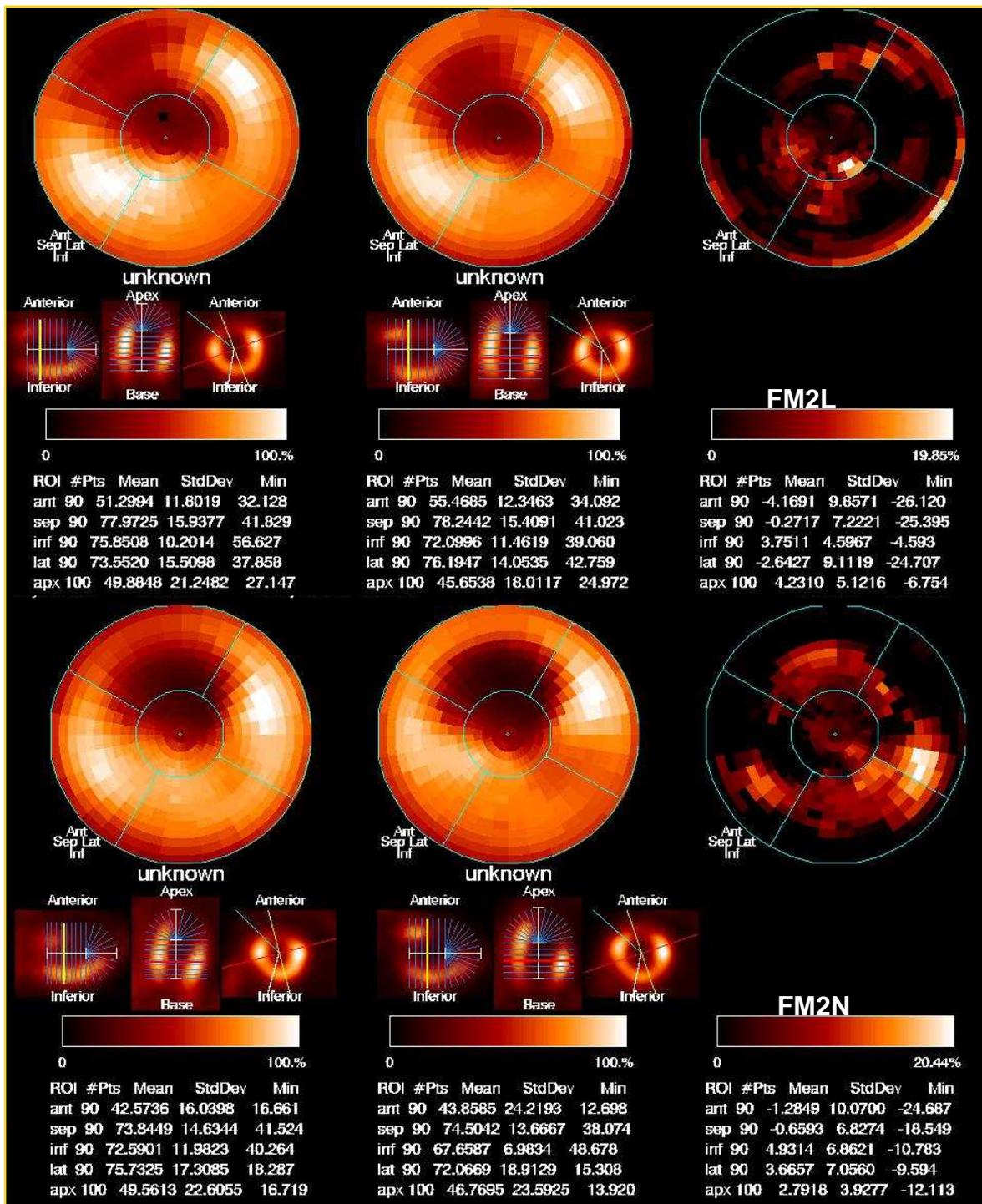


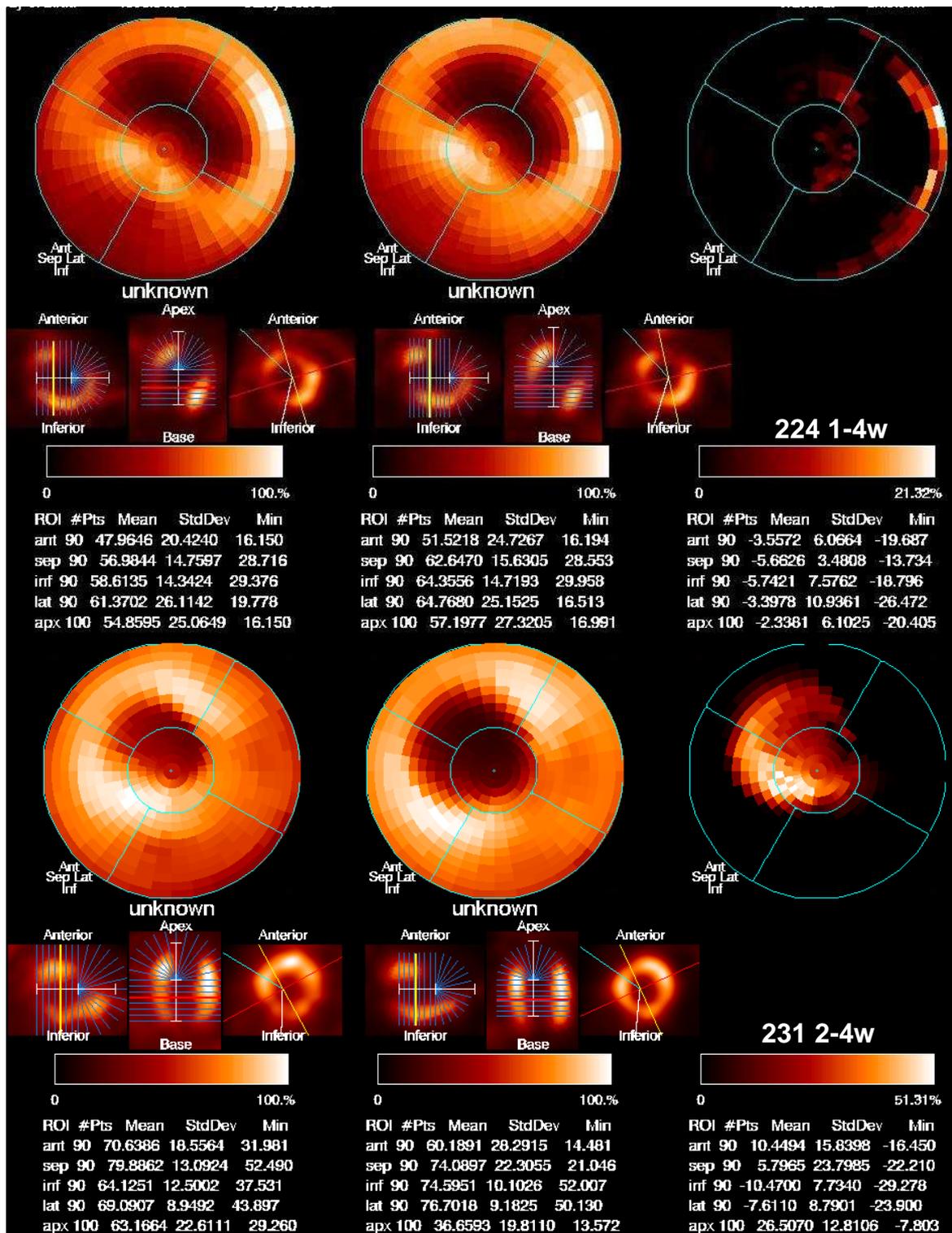
Figura 23. Quantificazione comparativa della captazione di  $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$  pre- e post-infarto

Anche le mappe polari acquisite per lo stesso soggetto in due tempi successivi dall'induzione dell'infarto sono state comparate per valutare le modificazioni del *pattern* di distribuzione regionale del [<sup>18</sup>F]-FDG in associazione al rimodellamento miocardico. In questo caso le mappe ottenute ai due tempi differenti sono state entrambe normalizzate per il valore massimo di attività miocardica.

Data l'esiguità delle osservazioni ripetute per uno stesso soggetto, non è stato possibile elaborare stime statistiche significative. In ogni caso, questi dati hanno permesso di saggiare le potenzialità applicative del software MH per confrontare i livelli di captazione di [<sup>18</sup>F]-FDG in fasi evolutive differenti del rimodellamento miocardico. A tale scopo, è stata adottata una suddivisione in ROI (*region of interest*) per "pareti miocardiche" (pareti anteriore, laterale, inferiore, setto ed apice) anziché per "territori vascolari" (arteria coronaria sinistra discendente, arteria coronaria sinistra circonflessa, arteria coronaria destra) secondo la prassi comunemente adottata in campo clinico, date le differenze nella vascolarizzazione regionale del miocardio tra uomo e topo precedentemente descritte. Il software fornisce i valori di media e deviazione standard della distribuzione regionale del radiotracciante nelle mappe polari normalizzate per il valore massimo di attività miocardica che fanno riferimento a due tempi di osservazione successivi rispetto all'epoca dell'infarto e calcola la differenza tra di esse (*vedi Figura 24 - 25*).



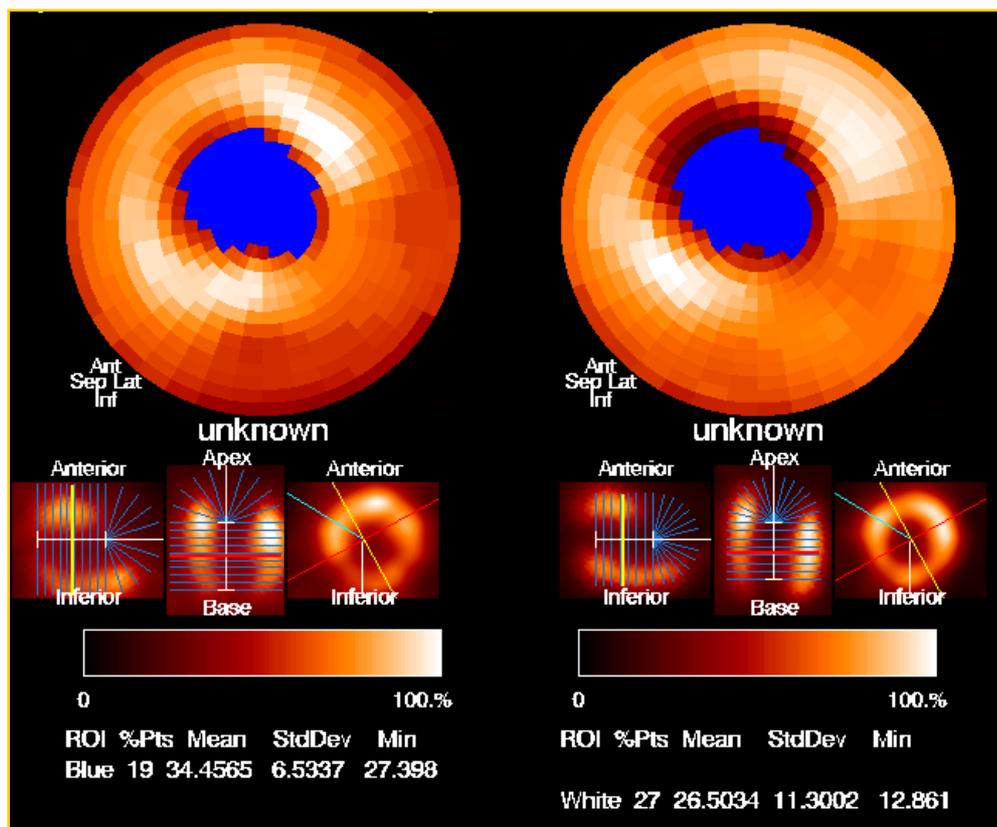
**Figura 24.** Quantificazione comparativa della captazione di  $[^{18}\text{F}]$ -FDG nei soggetti infartuati monitorati longitudinalmente



**Figura 25.** Quantificazione comparativa della captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nei soggetti infartuati monitorati longitudinalmente

Attraverso le mappe polari è stata calcolata l'estensione dell'area di infarto in valore percentuale per i due tempi successivi, come illustrato nella seguente tabella ed immagine esplicativa (Figura 26):

Identita' del topo	Tempo_I area infarto %	Tempo_II area infarto %
FM2L	1 giorno post infarto 38%	4 settimane post-infarto 37%
FM2N	1 giorno post infarto 31%	4 settimane post-infarto 26%
224	1 settimana post-infarto 37%	4 settimane post-infarto 32%
231	2 settimane post-infarto 34%	4 settimane post-infarto 26%



**Figura 26.** Variazioni dell'area d'infarto nei soggetti infartuati monitorati longitudinalmente

Per valutare eventuali cambiamenti nell'estensione dell'area d'infarto al progredire della cardiopatia, le misurazioni derivanti dai soggetti esaminati in due tempi sono state esaminate mediante un modello di regressione lineare che tiene in considerazione l'aggregazione dei dati, in modo da stimare la relazione tra il fattore temporale e l'estensione dell'area d'infarto espressa in  $\text{cm}^2$  o in valore percentuale dell'intero ventricolo sinistro. Il test di Wald non ha evidenziato modificazioni statisticamente significative dell'area infartuata nel tempo (area  $\text{cm}^2$  p-value 0.38; area % p-value 0.57). Studi sui ratti e sui topi hanno mostrato che nell'evoluzione dell'infarto il progressivo assottigliamento della parete ventricolare infartuata è associata alla sua riduzione in volume, ma senza evidente riduzione dell'estensione dell'area d'infarto in valore percentuale rispetto all'intera superficie ventricolare [27].

### **§ Analisi mediante PET/TC di un modello murino geneticamente modificato di infarto miocardico**

Il consumo di ossigeno a livello mitocondriale nel corso dei processi di ossidazione dei substrati energetici è in linea di massima accoppiato alla sintesi di ATP. Quest'ultima risulta associata durante le reazioni biochimiche di ossido-riduzione ad un flusso di elettroni da vari substrati all'ossigeno e di protoni attraverso le membrane mitocondriali. Tuttavia, la perdita di protoni ed elettroni può determinare il rilascio di energia non associato alla sintesi di ATP. Il disaccoppiamento della ossidazione dei substrati dalla sintesi di ATP è mediato da una famiglia di proteine mitocondriali che fungono da trasportatori anionici, definite *uncoupling proteins* (UCPs) [93]. L'UCP3 è localizzata a livello del tessuto adiposo bruno, dei muscoli scheletrici, dove è verosimilmente coinvolta nel metabolismo degli acidi grassi, e nel miocardio, dove il suo ruolo fisiologico rimane tuttora da definire [94]. Per studiare il ruolo della UCP3 nella regolazione del metabolismo energetico sono stati generati topi transgenici in cui

tale proteina è overespressa o deleta, ma questi modelli non hanno fornito risposte chiare ed univoche. Inoltre in letteratura sono riportate differenze nell'espressione di UCP3 nell'uomo e nei roditori da laboratorio, verosimilmente per divergenze nelle sequenze promotrici [95]. Modelli murini in cui UCP3 è overespresso presentano ridotti depositi adiposi e sono resistenti al diabete indotto mediante modificazioni dietetiche, mentre quelli *knockout* sono obesi e predisposti al diabete tipo 2 e mostrano maggiore sensibilità a livello muscolare al danno ossidativo. Attualmente sono disponibili dati limitati sull'attività dell'UCP3 cardiaca. In condizioni basali non sono state ravvisate significative differenze nel potenziale di membrana mitocondriale tra topi *wild type* e *knockout* per UCP3. In diverse condizioni patologiche è stata ipotizzata una correlazione tra il metabolismo energetico cardiaco e UCP3. Gli ormoni tiroidei o il digiuno inducono un incremento dell'espressione di UCP3 a livello cardiaco. In pazienti con insufficienza cardiaca, l'incremento dell'espressione di UCP3 è correlato ad una condizione di deficit energetico miocardico [93]. La positiva correlazione tra overespressione di UCP3 nell'insufficienza cardiaca ed il tasso plasmatico di acidi grassi non esterificati (*Free fatty acids*, FFAs) suggerisce un ruolo primario dell'UCP3 nel metabolismo degli acidi grassi, analogamente a quanto dimostrato per il tessuto muscolare scheletrico. L'aumentata espressione cardiaca di UCP3 in corso di insufficienza cardiaca incrementerebbe il trasporto degli acidi grassi attraverso le membrane mitocondriali, proteggendo i mitocondri dall'azione tossica legata all'accumulo di questi anioni [93]. Inoltre, in caso di ischemia e di riperfusione, i mitocondri producono “*reactive oxygen species*” (ROS) che possono danneggiare i cardiomiociti. L'UCP3 viene espressa in risposta ad un insulto ischemico, attivando un meccanismo citoprotettivo antiossidante, in quanto è capace di ridurre la produzione di ROS ed il conseguente danno da riperfusione. Pertanto queste proteine rappresentano dei potenziali bersagli terapeutici per la gestione dell'ischemia cardiaca [94]. Nel ratto è

stato dimostrato che l'espressione di UCP3 è inversamente associata alle dimensioni dell'infarto, attivando verosimilmente un meccanismo protettivo per prevenire la morte dei miocardiociti nel tessuto circostante l'area infartuata [96]. Il test di Wald eseguito sui coefficienti di una regressione lineare parametrico tra valori di captazione e genotipi, non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra soggetti *wild type* e *knockout* per il gene UCP3 relativamente ai valori di captazione del [<sup>18</sup>F]-FDG espressi in MBq/ml (wt vs ko: p-value 0.029), mentre emerge una differenza significativa per i valori espressi in SUV (wt vs ko: p=0.0023), con valori superiori per i soggetti UCP3 *knockout*. Analogamente, per evidenziare eventuali differenze nell'estensione dell'area d'infarto tra i due genotipi, i valori in percentuale e cm<sup>2</sup> dell'area infartuata sono stati comparati mediante test di Wald eseguito sui coefficienti di una regressione lineare tra area di infarto e genotipi. L'analisi di questi dati non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra soggetti *wild type* e *knockout* per il gene UCP3 relativamente all'estensione dell'area d'infarto (area cm<sup>2</sup> p=0.32; area percentuale p=0.26). L'area di superficie totale del ventricolo sinistro nei topi infartuati *wild type* è risultata mediamente 91.83±33.5 mm<sup>2</sup>, 95.26±22.41 mm<sup>2</sup> nei *knockout*. Il volume del ventricolo sinistro nei topi infartuati *wild type* è risultato mediamente 75.33 µl±46.3, 53,8 µl±24.2 nei *knockout*. Questi due parametri sono stati comparati nei soggetti infartuati appartenenti ai due genotipi mediante un modello di regressione lineare. Il test di Wald non ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'area di superficie e nel volume del ventricolo sinistro dei soggetti infartuati in base al genotipo (area di superficie mm<sup>2</sup> p-value 0.61; volume µl p-value 0.18).

## § Discussione e conclusioni

Nell'ultimo decennio i modelli murini di infarto del miocardio si sono dimostrati preziosi strumenti per indagare i meccanismi patogenetici della cardiomiopatia ischemica e testare approcci terapeutici innovativi, come la terapia genica o con cellule staminali. Nonostante le problematiche inerenti la risoluzione spaziale e temporale nell'imaging cardiaco sui piccoli roditori da laboratorio, la metodica PET/TC si è affermata nel campo della ricerca preclinica cardiovascolare, fornendo informazioni a livello molecolare estremamente utili per saggiare gli effetti di un trattamento terapeutico in seguito ad infarto miocardico. Per valutare l'efficacia di queste terapie, è estremamente importante la possibilità di determinare in maniera accurata l'estensione dell'area d'infarto, al pari di altri indici morfostrutturali e funzionali. La metodica PET/TC con [<sup>18</sup>F]-FDG si è dimostrata estremamente utile per la valutazione semiquantitativa del metabolismo regionale del glucosio a livello miocardico e per la misurazione quantitativa dell'estensione dell'area d'infarto nel modello murino, in modo accurato e ripetibile.

Essa consente di eseguire nel topo studi *in vivo*, in modo non invasivo e longitudinale, in cui ogni soggetto è controllo di sé stesso. Questi importanti aspetti, comuni a tutte le metodiche di imaging, consentono non solo di migliorare l'accuratezza dei risultati statistici, ma anche di ridurre significativamente il numero di animali impiegati nella ricerca, in accordo col principio etico del “*refinement, reduction, replacement*”. Il conseguimento di risultati ottimali in studi PET/TC su modelli murini nell'ambito della ricerca cardiovascolare richiede un coordinato approccio multidisciplinare ed una rigorosa pianificazione sperimentale, che contempli la razionale standardizzazione delle procedure operative inerenti la preparazione degli animali, il protocollo di acquisizione e ricostruzione delle immagini, e gli algoritmi d'analisi per eseguire valutazioni quantitative.

Nel presente studio sono ravvisabili alcuni limiti ed aspetti da approfondire.

Innanzitutto, il modello murino chirurgico di infarto del miocardio differisce dalla reale condizione patologica nell'uomo per una serie di aspetti. La legatura dell'arteria coronaria nel topo generalmente esita in un esteso infarto transmurale, con la possibilità di sviluppo di un aneurisma parietale. Nell'uomo invece, lo sviluppo di una circolazione collaterale e gli effetti potenzialmente protettivi di ripetuti insulti ischemici di lieve entità in corso di coronaropatia, comportano infarti meno estesi, non transmurali e si assiste raramente alla formazione di aneurismi. Dunque questo modello animale può non rispecchiare perfettamente l'ampio e complesso spettro di condizioni patologiche in cui l'evento ischemico acuto può evolvere nell'uomo.

Per quanto riguarda le misure, il SUV è un indice semiquantitativo utile in campo clinico ai fini diagnostici, ma quando si verificano errori nell'iniezione endovenosa del radiotracciante, è provato che il calcolo di questo parametro è inaccurato se non si effettua la correzione della quota reale di iniettato per quella stravasata. Questo evento è sporadico nell'uomo (1% dei casi), mentre nel topo risulta frequente una parziale extravasazione del radiotracciante, a causa del ridotto calibro della vena caudale laterale. Pertanto, per valutare correttamente la dose iniettata, è stata prospettata l'opportunità di stimare la quota di radiotracciante depositatasi nei tessuti perivasali mediante una scansione PET statica di 2 minuti della coda [55].

In questo studio è stata valutata mediante PET la vitalità miocardica, valutando il metabolismo glucidico mediante l'analogo [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, ma non sono stati raccolti dati in merito alla perfusione miocardica. In studi PET del cuore senza *gating*, i contorni del ventricolo sinistro potrebbero essere imprecisi e far sovrastimare le dimensioni di un infarto [77-79].

Per quanto riguarda l'analisi dei dati, quando si impiegano algoritmi che prevedono operazioni non automatiche per generare le mappe polari, ad esempio la

definizione dell'asse longitudinale, la base e la giunzione inferiore tra i due ventricoli, si evidenziano le differenze intra- ed inter-individuali legate in particolare all'esperienza dell'operatore, ma anche al software per la visualizzazione delle immagini o alle condizioni di lavoro [68]. Inoltre i valori calcolati da un software d'analisi automatico necessitano di una validazione mediante metodiche considerate “*gold standard*”, quali istologia, autoradiografia o RM. Ad ogni modo, un risultato promettente può essere considerato una riproducibilità intra- ed inter-operatore superiore all'80% anche nell'analisi di immagini PET in soggetti con infarto molto esteso. [91].

In ogni caso, sia pure considerando con attenzione le limitazioni sopra riportate, il nostro studio ha dimostrato la possibilità, mediante PET/TC con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, di effettuare nel topo da laboratorio una valutazione qualitativa del ventricolo sinistro e quantificare il metabolismo del glucosio a livello miocardico sia in soggetti sani che in modelli patologici, di discriminare tra tessuto vitale e non, e di determinare in maniera accurata e ripetibile l'estensione dell'area miocardica infartuata. I dati ricavati dallo studio mediante PET/TC di modelli sperimentali murini di infarto miocardico si configurano come una risorsa estremamente preziosa per la comprensione dei meccanismi molecolari dell'infarto miocardico nell'uomo e per migliorare la prevenzione, la diagnosi e la terapia di questa patologia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bellomi M, Petratta G. Dall'imaging morfologico a quello molecolare. *Oncologia Europea* 2005; 21: 32-37.
2. Conci E, Pachinger O, Metzler B. Mouse Models for Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Journal of Cardiology* 2006; 13: 239-244.
3. Badea C T, Bulcholz E, Hedlund L W, Rockman H A, Johnson G A. Imaging Methods for Morphological and Functional Phenotyping of Rodent Heart. *Toxicologic Pathology* 2006; 34:111-117.
4. Stegger L, Hoffmeier A N, Schäfers K P, Hermann S, Shoher O, Schäfers M A, Theilmeier G. Accurate Noninvasive Measurement of Infarct Size in Mice with High Resolution PET. *J Nucl Med* 2006; 47:1837-1844.
5. Recchia FA, Lionetti V. Animal Models of Dilated Cardiomyopathy for Translational Research. *Veterinary Research Communications* 2007; 31: 35-41.
6. van den Hoff M J, Kruithof B P, Moorman A F, Markwald R R, Wessels A. Formation of myocardium after the initial development of the linear heart tube. *Dev Biol* 2001: 61-76.
7. Waller B R, Wessels A. Cardiac morphogenesis and dysmorphogenesis II. An immunohistochemical approach. In: Tuan R. S., Lo C. W., editors. *Developmental Biology Protocols Vol. I*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc., 2000. p. 151-161.
8. Wessels A, Markwald R. Cardiac morphogenesis and dysmorphogenesis. I. Biol Normal development. *Method Mol Biol* 2000; 136: 239-259.
9. Wessels A, Sedmera D. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiological Genomics* 2003; 15:165-176.
10. Ciszek B, Skubiszewska D, Ratajska A. The anatomy of the cardiac veins in mice. *J Anat* 2007; 211: 53-63.

11. Kumar D, Hacker T A, Buck J, Hitesell L F W, Kaji E H, Douglas P S, Kamp T J. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coronary Artery Disease* 2005; 16: 41-44.
12. Tarnavski O, McMullen J R, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004; 16:349-360.
13. Doevendans P A, Daemen M J, de Muinck E D, Smits J F. cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular Research* 1998; 39: 34-49.
14. Shoi T, Kang P M, Douglas P S, Hampe J, Yballe C M, Lawitts J, Cantley L C, Izumo S. The conserved phosphoinositide3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 2000; 19: 2537-2548.
15. McMullen J R, Shioi T, Huang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood M, Brown J, Riggi L, Kang P M, Izumo S. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:4782-4793.
16. Hunter J J, Tanaka N, Rockman H A, Ross J Jr, Chien K R. Ventricular expression of a MLC-2 $\nu$ -ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* 1995; 270: 23173-23178.
17. Ikeda Y, Ross J Jr. Models of dilated cardiomyopathy in the mouse and hamster. *Current Opinion in Cardiology* 2000; 15:197-201.
18. Daugherty A, Lu H, Howatt D A, Rateri D L. Modes of defining atherosclerosis in mouse models: relative merits and evolving standards. *Cardiovascular Genomics, Methods in Molecular Biology* 2009; 573: 1-15.
19. Nilles KM, London BS, London B. Knockin Mouse Arrhythmia Models. *J Cardiovasc electrophysiol* 2007; 18: 1117-1125.

20. Miller T, Szczesna D, Housmans P R, Zhao J, de Freitas F, Gomes A V, Culbreath L, McCue J, Wang Y, Xu Y, Kerrick W G, Potter J D. Abnormal Contractile function in transgenic mice expressing a familial hypertrophic cardiomyopathy-linked troponin T (I79N) mutation. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276:3743-3755.
21. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, Tomioka N, Kawai C. Animal model of silent myocarditis in athymic mice. *Cardiovascular Research* 1986; 20: 768-773.
22. Mcgregor E, Dunn M J. Proteomics of heart disease. *Human Molecular Genetics* 2003; 12:135-144.
23. Schaub M C, Lucchinetti E, Zaugg . Genomics, transcriptomics, and proteomics of the ischemic heart. *Heart Metab* 2009; 42:4-9.
24. Kislinger T, Gramolini A O. Proteome analysis of mouse model systems: A tool to model human disease and for the investigation of tissue-specific biology. *J Prot* 2010; *in press*.
25. Bousette N, Kislinger T, Fong V, Isselin R, Hewel J A, Emili A, Gramolini A O. Large-Scale Characterization and Analysis of the Murine Cardiac proteome. *Journal of Proteome Research* 2009; 8. 1887-1901.
26. Chu G, Kerr J P, Mitton B, Egnaczyk G, Vazquez J A, Shen M, Kilby G W, Stevenson T I, maggio J E, Vockley J, Rapundalo ST, Kranias E G. Proteomic analysis of hyperdynamic mouse hearts with enhanced sarcoplasmic reticulum calcium cycling. *The FASEB Journal* 2004;18:1725-1727.
27. Takagawa J, Zhang Y, Wong M L, Sievers R E, Kapasi N K, Wang Y, Yeghiazarians Y, lee R J, Grossman W, Springer M L. Myocardial infarct size measurements in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and I-based approaches. *J Appl Physiol* 2007; 102: 2104-2111.

28. Saraste A, Nekolla S G, Schwainger M. Cardiovascular molecular imaging: an overview. *Cardiovascular Research* 2009; 83: 643-652.
29. Gilson W D, Kraitchman D L. Noninvasive Cardiovascular Imaging Techniques for Basic Science Research: Application to Cellular Therapeutics. *Rev Esp Cardiol* 2009; 8:918-927.
30. Scherrer-Crosbie M, Thibault H B. Echocardiography in traslational research: of Mice and Men. *J Am Soc Echocardiogr* 2008; 10: 1083-1092.
31. Liang H D, Blomley M J K. the role of ultrasound in molecular imaging. *The British Journal of Radiology* 2003; 76: 140-150.
32. Zhou Y Q, Foster F S, Nieman B J, Davidson L, Chen X J, Henkelman R M. comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging. *Physiol Genomics* 2004; 18:232-244.
33. Syed F, Diwan A, Hahn H S. manipulated and Surgycally Modeled Mice . *J Am Soc Echocardiogr* 2005; 18: 982-990.
34. Coatney R W. Ultrasound Imaging: Principles and Applications in Rodent Research. *ILAR Journal* 2001; 42: 233-247.
35. Dawson D, Lygate C A, Saunders J, Schneider J E, Ye X, Hulbert K, Noble J A, Neubauer S. Quantitative 3-dimensional echocardiography for Accurate and rapid cardiac phenotype Characterization in Mice. *Circulation* 2004; 110: 1632-1637.
36. Badea C T, Bucholz E, Hedlund L W, Rockman H A, Johnson G A. Imaging Methods for Morphological and Functional Phenotyping of Rodents Heart. *Toxicologic Pathology* 2006; 34: 111-117.
37. Bartling S H, Stiller W, Semmler W, Kiessling F. Small Animal Computer Tomography Imaging. *Current Medical Imaging Reviews* 2007; 3: 45-59.

38. Badea C T, Wetzel A W, Mistry N, Pomerantz S, Nave D, Johnson G A. Left ventricle volume measurements in cardiac micro-CT: The impact of radiation dose and contrast agent. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 2008; 32: 239-250.
39. Nahrendorf M, Badea C, Hendlund L W, Figueiredo J L, Sosnovik D E, Johnson G A, Weissleder R. High-resolution imaging of murine myocardial infarction with delayed-enhancement cine micro-CT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: 3172-3178.
40. Johnson K. Introduction to Rodent Cardiac Imaging. *ILAR J* 2008; 49: 27-34.
41. Ruff J, Wiesmann F, Lanz T, Haase A. Magnetic Resonance Imaging of Coronary Arteries and heart valves in a Living Mouse: Techniques and Preliminary Results. *Journal of Magnetic Resonance* 2000; 146: 290-296.
42. Stegger L, Heijman E, Shäfers K P, Nicolay K, Shäfers M A, Strijkers G J. Quantification of Left Ventricular Volumes and Ejection Fraction in Mice using PET, compared with MRI. *The Journal of Nuclear Medicine* 2009; 50: 132-138.
43. Kreissl M C, Wu H M, Stout D B, Ladno W, Schindler T H, Zhang X, prior J O, Prins M L, Chatziioannou A F, Huang S C, Schelbert H R. Noninvasive Measurements of Cardiovascular Function in Mice with High-Temporal-resolution Small-Animal PET. *The Journal of Nuclear Medicine* 2006; 47: 974-980 .
44. Klocke R, Tian W, Kuhlmann, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovascular Research* 2007; 74: 29-38.
45. Hastings R H, Torres D S. Direct Laryngoscopy in Mice. *Contemporary Topics* 1999; 38: 33-35.
46. Brown R H, Walters D M, Greenberg R S, Mitzner W. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *J Appl. Physiol.* 1999; 6: 2362-2365.

47. Vergari A, Polito A, Musumeci M, Palazzesi S, Marano G. Video-assisted orotracheal intubation in mice. *Laboratory Animals* 2003; 37: 204-206.
48. Winning J, Huwer h, Redjai J, Naumann C, Winning I, Scheider G, Bauer M. Noninvasive mechanical ventilation of mice by using a ballon-tipped cannula. *Contemporary Topics* 2004; 39-41.
49. Spoelstra E N, Ince C, Koeman A, Emons V M, Brouwer L A, van Luyn M J A, Westerink B H C, Remie R. A novel and simple method for endotracheal intubation of mice. *Laboratory Animals* 2007; 41:128-135.
50. Moldestad O, Karlsen P, Molden S, Storm J F. Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery. *Journal of Neuroscience Methods* 2009; 176: 57-62.
51. Monassier L, Theodoropoulos C, Sandler R, Constantinesco A. Current mouse models for studying cardiac dysfunctions: technical and imaging aspects. *Drug Discovery Today: Dis. Models.* 2004; 3: 235-241.
52. Sherif H M, Saraste A, Weidl E, Weber A W, Higuchi T, Reder S, Poethko T, Henriksen G, Casebier D, Robinson S, Wester H J, Nekolla S G, Schwaiger M. Evaluation of a novel  $^{18}\text{F}$ -labeled positron emission tomography perfusion tracer for the assessment of myocardial infarct size in rats. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2009; 2: 77-84.
53. Wollenweber T, Zach C, Rischpler C, Fisher R, Nowak S, Nekolla S G, Gröbner M, Übleis C, Assmann G, La Fougère C, Böning G, Cumming P, Franz W M, Hacker M. Myocardial Perfusion imaging is feasible for infarct size quantification in mice using clinical single-photon emission computed tomography system equipped with pinhole collimators. *Mol Imaging Biol* 2009; 12: 427-434.

54. Vogel-Claussen J, Rochitte CE, Wu KC, Kamel IR, Foo T K, Lima JA, Bluemke D A. Delayed enhancement MR imaging: utility in myocardial assessment. *Radiographics* 2006; 26: 795-810.
55. Lecchi M, Belloli S, Moresco R M, Lui R, Del Sole A, Fazio f, Lucignani G. Technical and methodological issues in preclinical imaging with PET and SPECT. *Minerva Biotec* 2009; 21: 123-134.
56. Riemann B, Schäfers K P, Schober O, Schäfers M. Small animal PET in preclinical studies: opportunities and challenges. *Q J NUCL MED MOL IMAGING* 2008; 52: 215-221.
57. Larobina M, Brunetti A, Salvatore M. Small Animal PET: a Review of Commercially Available Imaging Systems. *Current Medical imaging Reviews* 2006; 2: 187-192.
58. Del Guerra A, Belcari N. State of the art of PET, SPECT and CT for small animal imaging. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 2007; 583: 119-124.
59. Habte F, Foundray A M K, Olcott P D, Levin C S. Effects of system geometry and other physical factors on photon sensitivity of high-resolution positron emission tomography. *Phys. Med. Biol.* 2007; 52: 3753-3772.
60. Chatziioannou A F. Molecular Imaging of small animals dedicated PET tomographs. *European Journal of Nuclear Medicine* 2002; 29: 98-114.
61. Tatsumi M, Engles J M, Ishimori T, Nicely O B, Cohade C, Wahl R L. Intense  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in brown fat can be reduced pharmacologically. *J Nucl Med* 2004; 45: 1189-1193.
62. Fueger B J, Czernin J, Hildebrand I, tran C, Halpern B S, Stout D, Phelps M E, Weber W A. Impact of Animal handling on the results of  $^{18}\text{F}$ -FDG PET studies in mice. *J Nucl Med* 2006; 47: 999-1006.

63. Simões M V, Egert S, Ziegler S, Miyagawa M, Reder S, Lehner T, Nguyen N, Charron M J, Schwaiger M. D. Delayed response of insulin stimulated fluorine-18 deoxyglucose uptake in glucose transporter-4-null mice hearts. *Journal of American College of Cardiology* 2004; 43: 1690-1697.
64. Green L A, Gambhir S S, Srinivasan A, Banerjee P K, Hoh C K, Cherry S R, Sharfstein S, Barrio J B, Herschman H R, Phelps M E. Non invasive methods for quantitating blood time-activity curves from mouse PET images obtained with fluorine 18-fluorodeoxyglucose. *J Nucl Med* 1998; 39: 729-734.
65. Higuchi T, Nekolla S G, Jankaukas A, Weber A W, Huisman M C, Reder S, Ziegler S I, Schwaiger M, Bengel F M. Characterization of normal and infarcted rat myocardium using a combination of small animal PET and clinical MRI. *The Journal of Nuclear Medicine* 2007; 48: 288-294.
66. Hildebrand I J, Su H, Weber W A. Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. *ILAR J* 2008; 49: 17-26.
67. Abou-Madi N. 2006. Anesthesia and Analgesia of Small Mammals. Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals, Gleed R.D. and Ludders J.W. Eds. International Veterinary Information Service, Ithaca NY
68. Woo SK, Lee TS, Kim KM, Kim JY, Jung JH, Kang JH, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM. Anesthesia condition for F-FDG imaging of lung metastasis tumors using small animal PET. *Nuclear Medicine and Biology* 2008; 35: 143-150.
69. Ko BH, Paik JY, Jung KH, Bae JS, Young J, Ho K, Sang J, Lee EJ, Choe YS, Kim BT, Lee KH. Effects of anesthetic agents on cellular <sup>123</sup>I-MIBG transport and in vivo <sup>123</sup>I-MIBG biodistribution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35: 554-561.
70. Kober F, Iltis I, Cozzone P J, Bernard M. Myocardial blood flow mapping in mice using high resolution spin labelling magnetic resonance imaging: influence of

- ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. *Magnetic Resonance in Medicine* 2005; 53: 601-606
71. Toyama H, Ichise M, Liow J S, Vines D C, Seneca N M, Modell K J, Seidel J, Green M V, Innis R B. Evaluation of anesthesia effects on [<sup>18</sup>F]FDG uptake in mouse brain and heart using small animal PET. *Nuclear Medicine and Biology* 2004; 31: 251-256.
  72. Sampson UK, Dorbala S, Limaye A, Kwong R, Di Carli MF. Diagnostic accuracy of rubidium-82 myocardial perfusion imaging with hybrid positron emission tomography/ computed tomography in the detection of coronary artery disease. *Am Coll Cardiol*, 2007; 49: 1052-1058.
  73. Bateman TM, Heller GV, McGhie AI, Friedman JD, Case JA, Bryngelson JR, Hertenstein GK, Moutray KL, Reid K, Cullom SJ. Diagnostic accuracy of rest/stress ECG gated Rb-82 myocardial perfusion PET: comparison with ECG-gated Tc-sestamibi SPECT. *J Nucl Cardiol* 2006; 13: 24-33.
  74. Porenta G, Kuhle W, Czernin J, Ratib O, Brunken R C, Phelps M E, Schelbert H R. Semiquantitative assessment of myocardial blood flow and viability using polar map displays of cardiac PET images. *J Nucl Med* 1992; 33: 1623-1631.
  75. Zaidi H. *Quantitative Analysis in Nuclear Medicine Imaging*. Springer 2006.
  76. Nekolla S G, Miethaner C, Nguyen N, Ziegler S I, Schwaiger M. reproducibility of polar map generation and assessment of defect severity and extent assessment in myocardial perfusion imaging using positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 1313-1321.
  77. Lin G S, Hines H H, Grant G, Taylor K, Ryals C. Automated Quantification of Myocardial ischemia and wall motion defects by use of cardiac SPECT polar mapping and 4-dimensional surface rendering. *J Nucl Med Technol* 2006; 34: 3-17.

78. Wu M C, Gao D W, Sievers R E, Lee R J, Hasegawa B H, Dae M W. Pinhole single-photon emission computed tomography for myocardial perfusion imaging of mice. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 576-582.
79. Stegger L, Hoffmeier A N, Schäfers K P, Hermann S, Schober O, Schäfers M A, Theilmeier G. Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high resolution PET. *J Nucl Med* 2006; 47: 1837-1844.
80. Kudo T, Fukuchi K, Annala A J, Chatziioannou A F, Allada V, Dahlbom M, Tai Y C, Inubushi M, Huang S C, Cherry S R, Phelps M E, Schelbert H R. Noninvasive measurement of myocardial activity concentrations and perfusion defects sizes in rats with a new small animal positron emission tomography. *Circulation* 2002; 106: 118-123.
81. Acton P D, Thomas D, Zhou R. Quantitative imaging of myocardial infarct in rats with high resolution pinhole SPECT. *Int J Cardiovasc Imaging* 2006; 22: 429-434.
82. O'Connor M K, Hammell T, Gibbons R. In vitro validation of a simple tomographic technique for estimation of percentage myocardium at risk using methoxyisobutyl isonitrile technetium  $99^m$ (sestamibi). *European Journal of Nuclear Medicine* 1990; 17: 69-76.
83. Inglese E, Leva L, Matheoud R, Sacchetti G, Secco C, Gandolfo P, Brambilla M, Sambuceti G. Spatial and temporal heterogeneity of regional myocardial uptake in patient without heart disease under fasting conditions on repeated whole body  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2007; 48: 1662-1669.
84. Simpson E M, Linder C C, Sargent E E, Davisson M T, Mobraaten L E. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997; 16: 19-27.

85. Threadgill D W, Yee D, Matin A, Nadeau J H, Magnuson T. Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm Genome* 1997; 8: 390-393.
86. Seong E, Saunders T L, Stewart C L, Burmeister M. To knockout in 129 or C57Bl/6: that is the question. *TRENDS in Genetics* 2004; 20: 59-62.
87. Wang Y, Seidel J, Tsui B M W, Vaquero J J, Pomper M G. Performance evaluation of the GE Healthcare eXplore VISTA dual –ring small-animal PET scanner. *J Nucl Med* 2006; 47: 1891-1900.
88. Storto G, Cirillo P, Vicario M L E, Pellegrino T, Sorrentino A R, Petretta M, Galasso G, De Sanctis V, Piscione F, Cuocolo A. Estimation of coronary flow reserve by Tc-99m sestamibi imaging in patients with coronary artery disease: comparison with the results of intracoronary Doppler technique. *J Nucl Cardiol* 2004; 11: 682-688.
89. Vaidya D, Morley G E, Samie F H, Jalife J. Reentry and fibrillation in the mouse heart: a challenge to the critical mass hypothesis. *Circ Res.* 1999; 85: 174-181.
90. Wakimoto H, Maguire C T, Kover P, Hammer P E, Gehrman J, Triedman J K, Berul C I. Induction of atrial tachycardia and fibrillation in mouse heart. *Cardiovascular Research* 2001; 50: 463-473.
91. Nekolla S G, Miethaner C, Nguyen N, Ziegler S I, Schwaiger M. Reproducibility of polar map generation and assessment of defect severity and extent assessment in myocardial perfusion imaging using positron emission tomography. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 1313-1321.
92. Stegger L, Schäfers K P, Flögel U, Lefteris L, Hermann S, Jacoby C, Keul P, Conway E M, Schiber O, Schrader J, Levkau B, Schäfers M. Monitoring Left Ventricular Dilation in Mice with PET. *J Nucl Med* 2005; 46: 1516-1521.

93. Nabben M, Hoeks J. Mitochondrial uncoupling protein 3 and its role in cardiac and skeletal muscle metabolism. *Physiology and Behaviour* 2008; 94: 259-269.
94. Cadenas S, Aragonés J, Landàzuri M O. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensor in ischemic heart disease. *Cardiovascular Research* 2010; 88: 219-228.
95. Ljubicic V, Adhihetty P J, Hood DA. Role of UCP3 in state 4 respiration during contractile activity-induced mitochondrial biogenesis. *J Appl Physiol* 2006; 97: 976-983.
96. Laskowski K R, Russell R R. Uncoupling Proteins in Heart Failure. *Current heart Failure Reports* 2008; 5: 75-79

## ICONOGRAFIA

- Figura 1.** Wessels A, Markwald R. Cardiac morphogenesis and dysmorphogenesis. I. Biol Normal development. *Method Mol Biol* 2000; 136: 239-259.
- Figura 2.** Anatomia delle arterie coronarie nell'uomo.  
Da *my.clevelandclinic.org*
- Figura 3.** Kumar D, Hacker T A, Buck J, Whitesell L F, Kaji EH, Douglas P S, Kamp T J. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coronary Artery Disease* 2005; 16: 41-44.
- Figure 4-5-6.** Da *www.cardiogenomics.org*
- Figura 7.** Riemann B, Schäfers K P, Schober O, Schäfers M. Small animal PET in preclinical studies: opportunities and challenges. *Q J NUCL MED MOL IMAGING* 2008; 52: 215-221.
- Figura 8.** Burckhardt D D. Cardiac Positron Emission Tomography: Overview of Myocardial Perfusion, Myocardial Blood Flow an Coronary Flow reserve Imaging. *www.siemens.com.mi*  
Lin G S, Hines H H, Grant G, Taylor K, Ryals C. Automated quantification of myocardial ischemia and wall motion defects by use of cardiac SPECT polar mapping and 4-dimensional surface rendering. *J Nucl Med Technol* 2006; 34: 3-17.
- Figura 9.** Analisi semiquantitativa con il software eXplore Vista PET/TC
- Figura 10.** Analisi semiquantitativa con il software "Munich Heart"
- Figura 11.** Quantificazione dell'area d'infarto e ricostruzione 3D del ventricolo sinistro con il software "Munich Heart"

- Figura 12.** Analisi qualitativa del ventricolo sinistro mediante PET/TC con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG in topo normale
- Figura 13.** Distribuzione regionale del [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nel ventricolo sinistro
- Figura 14.** Dimensioni del cuore del topo
- Figura 15.** “*Midmyocardial contour*” in sezione assiale del ventricolo sinistro
- Figura 16.** PET/TC con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG in modello murino di infarto del miocardio
- Figura 17.** Infarto del miocardio della parete antero-laterale e dell’apice del ventricolo sinistro, con ipocaptazione del setto basale
- Figura 18.** Dilatazione della cavità ventricolare in seguito ad infarto del miocardio e segni di alterata funzione respiratoria
- Figura 19.** Ricostruzione del profilo miocardico in ventricolo infartuato con il software Munich Heart
- Figura 20.** Area di superficie e volume ventricolare in soggetto infartuato calcolati con il software Munich Heart
- Figura 21.** Misurazione dell’estensione dell’area d’infarto con il software Munich Heart
- Figura 22.** Monitoraggio longitudinale mediante PET/TC dei soggetti infartuati
- Figura 23.** Quantificazione comparativa della captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG pre- e post-infarto
- Figura 24 - 25.** Quantificazione comparativa della captazione di [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG nei soggetti infartuati monitorati longitudinalmente
- Figura 26.** Variazioni dell’area d’infarto nei soggetti infartuati monitorati longitudinalmente

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare innanzitutto il Prof. Marco Salvatore, Coordinatore del Dottorato di Ricerca, ed il Prof. Francesco Salvatore, Presidente del CEINGE, per il percorso formativo in cui mi hanno sapientemente guidato. Ringrazio il mio relatore, Prof. Arturo Brunetti, per la fiducia e la stima tributatemi e per la preziosa e costante supervisione. Ringrazio il mio corelatore, Prof. Alberto Cuocolo, per la cortese attenzione e disponibilità che ha avuto nei miei confronti. Un ringraziamento particolare al Dott. Michele Larobina ed alla Dott.ssa Maria Rosaria Panico, per avermi trasmesso con estrema pazienza e generosità tutta la loro esperienza. Ringrazio inoltre il Dott. Stephan Nekolla ed il caro amico Prof. Antonio Eleuteri per l'impagabile disponibilità ed il prezioso aiuto. Un ringraziamento affettuoso alla Prof.ssa Adelaide Greco ed al Dott. Matteo Gramanzini, quotidiani compagni di lavoro nel corso del mio dottorato di ricerca ed a tutti coloro che in qualche modo mi hanno offerto il prezioso dono della condivisione del sapere.