

**UNIVERSIA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**"FEDERICO II"**

**Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali**

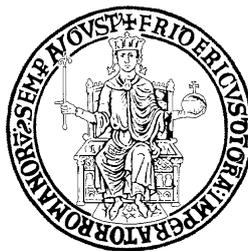
**Scuola di dottorato in Morfologia Clinica e Patologica**

**XXIII Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Stefania Montagnani**

**Tesi di dottorato di ricerca**

**LA MATRICE EXTRACELLULARE PRODOTTA DAI  
FIBROBLASTI CARDIACI E' IL SUBSTRATO OTTIMALE PER  
L'ESPANSIONE *EX VIVO* DELLE CELLULE STAMINALI  
CARDIACHE**



**RELATORE:**

**Prof. Stefania Montagnani**

**CANDIDATO:**

**Dott. Rita Miraglia**

**ANNO ACCADEMICO 2009/2010**

## INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>6</b>
1.1. CELLULE STAMINALI NEL CUORE ADULTO.....	6
1.2. COMPOSIZIONE E FUNZIONI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE CARDIACA.....	7
1.3. COMPOSIZIONE E FUNZIONI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE NEL CUORE PATOLOGICO .....	9
1.4. BIOINGEGNERIA.....	12
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>15</b>
3.1. ISOLAMENTO E COLTURA DELLE CELLULE PRIMITIVE CARDIACHE .....	15
3.1.1. ALLESTIMENTO DELLA COLTURA PRIMARIA.....	15
3.1.2. ISOLAMENTO DEI FIBROBLASTI E DELLE CELLULE CD117(+)......	15
3.2. PRODUZIONE CARDIOGEL.....	16
3.2.1. IMMUNOFLUORESCENZA .....	16
3.2.2. IMMUNOBLOTTING .....	17
3.3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA NELLE CELLULE CD117 (+).....	18
3.4. IMMUNOFLUORESCENZA SULLE CELLULE CD117(+)......	18
3.5. COLTURE DELLE CELLULE PRIMITIVE CARDIACHE SULLE PROTEINE DELLA ECM E SUL CARDIOGEL.....	19
3.5.1. VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE.....	19
3.5.2. VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI.....	20
3.5.3. IMMUNOFLUORESCENZA PER LE CATENE INTEGRINICHE.....	20
3.5.4. BLOCCO DELL'ATTIVITA' DELLE INTEGRINE.....	21
3.6. ANALISI STATISTICHE DEI DATI.....	21
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>22</b>
4.1. CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE PRIMITIVE CARDIACHE.....	22
4.2. VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DELLE PROTEINE DELL'ECM SULLA BIOLOGIA DELLE CPC.....	23
4.3. CARATTERIZZAZIONE DEL CARDIOGEL ED EFFETTI SULLE CPC IN CONDIZIONI NORMALI E PATOLOGICHE.....	24
4.5. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE INTEGRINE SULLE CPC IN COLTURA SUL CARDIOGEL.....	25
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>26</b>

<b>6. ICONOGRAFIA.....</b>	<b>31</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>44</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>50</b>

## ***SOMMARIO***

Il cuore umano adulto possiede una riserva di cellule staminali, CD117 positive, che sono capaci di differenziare nelle tre principali linee cellulari cardiache, contribuendo al turnover cellulare.

*In vivo*, le cellule primitive cardiache sono circondate da uno specifico microambiente, costituito dalle diverse componenti della matrice extracellulare (ECM). Molti studi hanno dimostrato che l'alterazione dell'architettura dell'ECM, tipica del rimodellamento che segue l'infarto del miocardio, si oppone alla rigenerazione tissutale, ostacolando anche il successo dei diversi approcci di terapia cellulare. Per tale motivo, negli ultimi anni, sono aumentati gli studi di bioingegneria volti alla rigenerazione del miocardio mediante l'utilizzo di cellule in associazione con diversi biomateriali, al fine di ristabilire un'architettura tissutale più simile a quella del miocardio sano.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di chiarire, *in vitro*, gli effetti di una ECM naturale (*Cardiogel*), ottenuta dalla coltura di fibroblasti isolati da cuori umani adulti normali e da cuori espianati per insufficienza cardiaca post-ischemica, sulla biologia delle cellule primitive cardiache (CPC) CD117 positive (+) anch'esse isolate da cuori umani adulti normali e post-ischemici. Come dimostrato da analisi di immunofluorescenza e di immunoblotting, i fibroblasti normali sintetizzano una maggiore quantità di laminina-2 rispetto ai fibroblasti patologici, che invece sintetizzano soprattutto laminina-1; inoltre, dagli studi condotti sulla proliferazione e sull'apoptosi, *in vitro*, delle cellule CD117(+), è emerso che il *cardiogel* patologico stimola maggiormente la proliferazione delle CPC, proteggendole, allo stesso tempo, dall'apoptosi. Dall'analisi dell'espressione delle catene integriniche sulle cellule CD117 (+) in coltura sul *cardiogel*, e dallo studio del blocco dell'attività di specifiche catene integriniche, è emerso che la proliferazione cellulare è associata all'espressione delle integrine  $\alpha_2$  e  $\beta_3$ , mentre la protezione dall'apoptosi è associata all'espressione delle integrine  $\alpha_6$  e  $\alpha_2$ .

Sebbene resti ancora da studiare il comportamento delle cellule primitive cardiache CD117 (+) in associazione con una matrice tridimensionale, questo studio dimostra che le variazioni nella composizione della ECM possono avere un ruolo importante nell'influenzare la biologia delle cellule primitive cardiache.

Quindi, poiché dalla composizione della matrice extracellulare può dipendere il destino delle CPC, risulta evidente che qualsiasi approccio di terapia cellulare e di bioingegneria, volto alla rigenerazione miocardica, non possa sottovalutare l'influenza del microambiente extracellulare.

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. CELLULE STAMINALI NEL CUORE ADULTO**

Recenti studi hanno dimostrato la presenza nel cuore umano adulto di cardiomiociti in divisione mitotica e ciò ha permesso di superare il vecchio paradigma secondo cui il cuore sarebbe un organo post-mitotico (1).

La vera rivoluzione in ambito scientifico si è avuta con la scoperta nel cuore umano adulto di cellule staminali cardiache, individuate dall'espressione del recettore per lo *stem cell factor*, c-kit, noto anche come CD117, che differenziandosi sono capaci di dare origine a progenitori e precursori dei cardiomiociti. I progenitori coesprimono tipici fattori di trascrizione, come GATA-4, Nkx2.5 e Mef-2C, mentre i precursori esprimono marcatori citoplasmatici come l'actina  $\alpha$ -sarcomerica e la catena pesante della miosina cardiaca (2,3).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che tali cellule staminali cardiache sono in grado di dare origine anche a cellule muscolari lisce e cellule endoteliali dei vasi sanguigni (3).

Recentemente è stato dimostrato, anche *in vivo*, che le cellule CD117 (+) isolate da cuori umani adulti normali sono capaci di rigenerare tutte le strutture cardiache, quando iniettate nel miocardio infartuato di topi immunodeficienti o in ratti immunosoppressi (4).

La scoperta di cellule staminali CD117(+) nel cuore umano adulto ha suggerito la possibilità di rigenerare il miocardio attraverso la loro attivazione. Tuttavia nonostante la presenza di tale riserva cellulare, vari studi hanno dimostrato che dopo l'infarto del miocardio la rigenerazione avviene solo in una ristretta regione del ventricolo, ai bordi della zona danneggiata; il danno ischemico oltrepassa la risposta proliferativa e differenziativa delle cellule staminali cardiache, così che lo *shock* cardiogeno sopravviene (5,6).

Nel tentativo di capire perché le cellule primitive cardiache non riescano a riparare il danno post-ischemico, deve essere presa in considerazione anche l'influenza del microambiente e delle diverse proteine della matrice extracellulare (ECM) sulle cellule staminali cardiache.

In vivo, la ECM fornisce un substrato strutturale, chimico e meccanico che è essenziale per lo sviluppo, la crescita, l'omeostasi e gli adattamenti alle condizioni fisiopatologiche del cuore. Infatti essa riveste un ruolo fondamentale nel processo di rimodellamento cardiaco che fa seguito all'infarto, con l'aumento di collagene e la formazione della cicatrice.

## 1.2. COMPOSIZIONE E FUNZIONI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE CARDIACA

Nel cuore la ECM viene definita come una fitta rete che circonda e supporta cardiomiociti, capillari e fibroblasti, contribuendo all'integrità strutturale e funzionale del cuore. Essa svolge un ruolo importante nell'influenzare il comportamento cellulare, regolando, ad esempio, la migrazione, la proliferazione, l'adesione e il *signalling* cellulare. Pertanto l'ECM non può essere considerata soltanto una struttura statica, ma piuttosto un complesso sistema di interazioni dinamiche tra molecole della matrice, cellule residenti, proteine transmembrana e proteine del *signalling*.

L'ECM è costituita da una complessa rete di proteine strutturali (quali collagene e fibre elastiche) e di proteine multiadesive (come la fibronectina e le laminine), immerse in un ambiente ricco di proteoglicani e glicosaminoglicani.

La capacità delle cellule cardiache di sintetizzare le componenti della ECM varia tra un tipo cellulare e l'altro. I cardiomiociti producono il collagene di tipo IV e VI, la laminina e i proteoglicani, mentre i fibroblasti, che corrispondono al 70% delle cellule cardiache, sono i principali responsabili della produzione di collagene (tipo I e III) e fibronectina ed, inoltre, attraverso la sintesi delle metalloproteasi (MMPs) e degli inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs), regolano la degradazione e il *turnover* dell'ECM (7).

Il collagene è la proteina fibrosa, non solubile, più importante e abbondante della matrice, esso comprende una famiglia di proteine correlate, ma geneticamente distinte, che condividono alcune caratteristiche di organizzazione molecolare. Nel miocardio sono stati identificati sei tipi di collagene (I, III, IV, V, VI e VIII).

Il collagene I e III, che rappresentano la quota più abbondante, sono responsabili del mantenimento della struttura tissutale e delle proprietà visco-elastiche del miocardio. I collagene I, III e V formano fibrille con una configurazione ad elica destrorsa ed insieme costituiscono la matrice interstiziale. Il collagene di tipo VI è associato alla superficie laterale delle fibrille di collagene di tipo I e può unirle assieme formando fibre di collagene più spesse.

Il collagene di tipo IV è una molecola insolita in quanto è composta da regioni a tripla elica relativamente corte, separate da domini globulari che conferiscono flessibilità alla molecola. Queste molecole vengono assemblate in reticoli simili a lamine, formando un reticolo fibroso bidimensionale che costituisce la componente basilare della lamina basale (8,9).

Il collagene di tipo VIII è espresso prevalentemente durante lo sviluppo cardiaco, intervenendo nella formazione delle valvole cardiache, mentre nel miocardio adulto è presente a livelli molto bassi (10).

Le fibre elastiche sono meno numerose delle fibre di collagene, strutturalmente sono formate da una matrice amorfa centrale, costituita da elastina, attorniata da esili microfibrille di fibrillina, organizzate in una disposizione altamente ordinata. La caratteristica principale di queste fibre è l'elevata elasticità, e nel miocardio, esse sono in stretta associazione con i collagene fibrillari, permettendo al tessuto cardiaco di contrastare forze di tensione notevoli, deformandosi, per poi ritornare allo stato di distensione originario (11).

La fibronectina è una proteina multiadesiva della matrice, la cui funzione principale è quella di ancorare le cellule alla ECM, ma essa controlla anche la forma delle cellule e l'organizzazione del citoscheletro; inoltre durante l'embriogenesi è fondamentale per la migrazione e il differenziamento cellulare. Tuttavia la fibronectina riveste un ruolo importante anche nel processo di cicatrizzazione, in quanto facilita la migrazione dei macrofagi e di altre cellule del sistema immunitario nell'area lesionata.

La fibronectina è secreta dalle cellule sotto forma di dimero solubile costituito da due polipeptidi, uniti a livello delle loro estremità carbossiliche mediante due ponti disolfuro. Sono state identificate almeno 20 differenti catene di fibronectina, tutte generate per *splicing* alternativo del trascritto primario dell'RNA di un unico gene per la fibronectina. È stato dimostrato che ciascun polipeptide contiene sei domini; ogni dominio, a sua volta, contiene sequenze ripetute che possono essere distinte in tre tipi (tipo I, II e III). Le proprietà multiadesive della fibronectina dipendono dalla presenza, in domini diversi della proteina, di siti di legame ad alta affinità per il collagene, glicosamminoglicani, altre componenti della ECM e per le integrine, recettori specifici presenti sulla superficie delle cellule.

Il legame della fibronectina alle integrine è molto importante perché permette l'attivazione della fibronectina e la sua successiva organizzazione in fibrille. Diversi studi hanno dimostrato che la sequenza tripeptidica Arg-Gln-Asp (RGD) è il requisito strutturale indispensabile per il legame con le integrine cellulari. Man mano che l'assemblaggio procede, i dimeri di fibronectina formano corte fibrille, poi convertite in una densa rete di fibrille insolubili, che garantiscono un microambiente dinamico per le cellule (8,9,12).

Le laminine, principali costituenti delle membrane basali, appartengono ad una famiglia di glicoproteine. Ogni laminina è un eterotrimerico formato da subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , secrete ed assemblate per formare una molecola plasmata a croce che può legarsi ad altre macromolecole della ECM e creare interazioni cellulari uniche e scambievoli mediate prevalentemente dalle integrine, ma anche da destroglicani e altri recettori. Mediante tali interazioni le laminine contribuiscono al differenziamento cellulare, alla forma cellulare e al movimento, al mantenimento del fenotipo tissutale e alla promozione della sopravvivenza tissutale.

Nei mammiferi sono state descritte cinque catene  $\alpha$ , quattro catene  $\beta$  e tre catene  $\gamma$ , inoltre almeno tre delle catene della laminina ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\gamma_3$ ) possono dare origine a varianti diverse per *splicing* alternativo. Queste subunità si assemblano per formare quindici varianti note di laminina.

La maggior parte delle membrane basali esprime almeno una laminina e, recentemente, ad ognuna di esse è stato assegnato un numero che identifica univocamente la composizione della proteina.

Le laminine compaiono durante le fasi iniziali dello sviluppo embrionale e, successivamente, si distinguono in una larga varietà di isoforme tessuto-specifiche.

Nel cuore le laminine più importanti sono due: la laminina 1 ( $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$ ) espressa maggiormente durante la prima parte dell'embriogenesi; la laminina-2 (nota anche come merosina) ( $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$ ) che garantisce la giusta organizzazione strutturale dei cardiomiociti. (7, 13,14).

La corretta funzionalità cardiaca si basa sulla trasmissione di forze tra i cardiomiociti e l'impalcatura dell'ECM. L'interazione di queste componenti è garantita dalle integrine, una famiglia di recettori transmembrana che, ancorando le proteine del citoscheletro alla ECM, mediano un *signaling* bidirezionale a ridosso della membrana plasmatica. Le integrine sono recettori eterodimerici, costituiti da una subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Sebbene siano state identificate 18 subunità  $\alpha$  e 8 subunità  $\beta$ , nel miocardio sono presenti soltanto una ristretta sottopopolazione di recettori integrinici (15,16).

### *1.3. COMPOSIZIONE E FUZIONI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE NEL CUORE PATOLOGICO*

Il rimodellamento miocardico, che segue la cardiomiopatia ischemica, è un complesso meccanismo che coinvolge uno svariato numero di molecole e fattori cellulari. Esso per definizione corrisponde

all'alterazione della forma, delle dimensioni e della funzione dei ventricoli, sia nella zona infartuata che nelle aree non interessate dall'infarto (17).

È noto che una ECM ben organizzata, con un'adeguata espressione spazio-temporale delle sue componenti proteiche, è indispensabile per la corretta formazione e funzione d'organo (14).

Lo sviluppo della cardiomiopatia ischemica, così come la sua progressione verso l'insufficienza cardiaca, sono accompagnati da drastiche alterazioni sia a livello cellulare che nella composizione e nella struttura della ECM.

Gli eventi cellulari e molecolari coinvolti nella risposta riparativa del rimodellamento cardiaco, possono essere divisi in tre fasi tra loro sovrapponibili: la fase infiammatoria, la fase proliferativa e la fase maturativa.

Durante la fase infiammatoria, la morte dei cardiomiociti e il forte stress ossidativo che si genera in seguito all'evento ischemico innescano diversi *pathways* che, convergendo sull'attivazione del *Nuclear Factor- $\kappa$ B* (Nf- $\kappa$ B), inducono l'espressione di citochine, chemochine e di molecole di adesione, responsabili del reclutamento leucocitario nel sito ischemico. Le citochine infiammatorie stimolano l'attivazione di numerose MMPs che degradano l'ECM; mentre l'aumento della permeabilità capillare induce la fuoriuscita del fibrinogeno e della fibronectina plasmatica che formano una matrice provvisoria a supporto della migrazione e della proliferazione di cellule leucocitarie, fibroblasti e cellule endoteliali (18). La degradazione dell'ECM cardiaca, a sua volta, porta alla liberazione di diversi frammenti proteici a basso peso molecolare con proprietà pro-infiammatorie (19); inoltre le stesse MMPs sono capaci di modulare direttamente la risposta infiammatoria processando citochine, chemochine e fattori di crescita (20). Una volta che l'infiltrato leucocitario ha ripulito l'area ischemica dalle cellule necrotiche, si ha la transizione alla fase "proliferativa", associata all'inibizione dei segnali pro-infiammatori, alla deposizione di tessuto fibrotico e alla promozione dell'angiogenesi. In particolare si ha la degradazione della matrice provvisoria di derivazione plasmatica, e la produzione di una matrice di secondo ordine costituita prevalentemente da fibronectina, secreta dai fibroblasti e dai macrofagi reclutati nel sito di danno.

La tensione meccanica, l'attivazione del *pathway* del *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1), e la deposizione di fibronectina, in particolare della variante per *slicing* alternativo ED-A, contribuiscono al transdifferenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti (21,22). I miofibroblasti sono le cellule protagoniste del processo ripartivo, infatti, attraverso la sintesi di collagene fibroso,

sono responsabili della formazione della cicatrice che stabilizza la parete ventricolare e, inoltre, le capacità contrattili di tali cellule contribuiscono a ridurre l'espansione dell'infarto (23). La fase maturativa, invece, è caratterizzata dalla riduzione del numero di miofibroblasti attivati e di cellule endoteliali, attraverso l'innescamento di *pathways* apoptotici, ed è associata alla maturazione della cicatrice fibrotica mediante la formazione di legami crociati tra le fibre di collagene. Questo fenomeno determina la formazione di una cicatrice fibrotica priva di attività metabolica e con una maggiore rigidità che conferisce all'infarto resistenza meccanica.

Sebbene il collagene sia la proteina maggiormente prodotta durante la fibrosi ripartiva, esso non è l'unica proteina a regolare il rimodellamento cardiaco. Un ruolo importante è svolto da proteine quali la laminina, la fibronectina e le proteine matricellulari, la cui espressione aumenta notevolmente nel miocardio post-ischemico. La laminina e la fibronectina incrementano il processo infiammatorio generando peptidi ad elevato potere chemiotattico ed, inoltre, intervengono nell'induzione di diverse MMPs (24-26). Le proteine matricellulari, quali la tenascina e l'osteopontina, sono proteine accessorie, prive di funzione strutturale, che regolano le interazioni cellula-matrice e partecipano alla corretta disposizione dell'ECM, soprattutto durante lo sviluppo embrionale. Diversi studi hanno dimostrato che, nel rimodellamento ventricolare, tali proteine guidano la deposizione di nuova ECM modulando l'adesione dei cardiomiociti alla matrice neosintetizzata, e contribuiscono a limitare l'espansione dell'infarto (27). La funzione di tali proteine è fondamentale per la regolazione degli stadi iniziali del processo ripartivo, tuttavia un'espressione prolungata è spesso dannosa, come dimostrato da studi che hanno correlato livelli sierici elevati di tenascina-C ad un eccessivo rimodellamento e ad una prognosi infausta (28).

Benché il rimodellamento cardiaco si insaturi come un meccanismo ripartivo che, in seguito al fallimento dei fenomeni rigenerativi, è volto a rendere adeguata la gittata cardiaca, esso diventa un adattamento patologico, portando alla generazione di disfunzioni contrattili e, come ultimo stadio, all'insufficienza cardiaca (29). Il meccanismo alla base di tale transizione sarebbe l'alterato equilibrio che si viene a generare tra le MMPs ed i relativi inibitori. L'eccessiva attivazione delle MMPs e, quindi, l'incontrollata degradazione delle componenti dell'ECM che ne scaturisce, possono determinare effetti deleteri per la funzionalità cardiaca (30,31). Le MMPs, infatti, sono enzimi capaci di degradare un ampio spettro di substrati proteici, e, di conseguenza, oltre che compromettere l'integrità della rete di collagene, interferiscono anche con la capacità dei

cardiomiociti di interagire con le proteine della membrana basale, determinando perdita dell'allineamento e dell'adesione cellulare (32).

Inoltre, l'attivazione delle MMPs innesca un circolo vizioso in cui la degradazione dell'ECM promuove la sintesi di una matrice la cui composizione differisce rispetto a quella del miocardio sano; si accumulano, infatti, proteine ossidate e maggiormente *crosslinked* che hanno un *turnover* più lento e che perciò favoriscono la formazione di un'impalcatura meno flessibile.

Lo sviluppo della fibrosi, quindi, provoca un aumento della rigidità miocardica con conseguente sviluppo di aritmie ed ostacola l'eiezione sistolica rendendo eterogenea la composizione del miocardio.

#### 1.4. BIOINGEGNERIA

Dopo l'infarto si assiste ad una generale compromissione del miocardio che determina l'instaurarsi dell'insufficienza cardiaca, principale causa di morte nel mondo occidentale. Numerosi studi di terapia cellulare in modelli animali per la rigenerazione cardiaca hanno ottenuto risultati positivi, con miglioramento della funzione cardiaca (4,33-35), tuttavia i primi *trials*-clinici con iniezione intramiocardica di cellule staminali midollari si sono dimostrati di scarsa efficacia (36,37).

Questi insuccessi sembrano dovuti alla limitata capacità di attecchimento e di sopravvivenza nell'area ischemica di tali cellule (38).

Ciò ha spostato l'interesse della comunità scientifica verso gli sviluppi della "Bioingegneria" tissutale (39-42).

Questa nuova disciplina prevede di ottenere la rigenerazione tissutale mediante l'uso combinato di cellule staminali e biomateriali per la costruzione di impalcature artificiali (*scaffold*) che, riproducendo la funzione biologica e meccanica della ECM naturale, permettono la ricostruzione *in vitro* di un tessuto funzionale.

I biomateriali forniscono un ambiente tridimensionale per le cellule, con un'architettura adeguata che consente l'adesione cellulare e permette di veicolare, con un alto grado di efficienza, le cellule in specifici siti tissutali. Essi costituiscono anche un supporto meccanico che consente lo sviluppo tridimensionale del tessuto e conferisce al tessuto stesso una notevole resistenza.

Le caratteristiche principali degli *scaffolds* di bioingegneria sono la biocompatibilità e la biodegradabilità, ovvero i prodotti derivati dalla loro degradazione non devono essere tossici.

Tra i materiali utilizzati per la costruzione di impalcature artificiali di bioingegneria si riscontrano diversi polimeri sintetici (composti di poliuretano, carbonato, acido poliglicolico, etc.), ma anche materiali naturali come chitosano, fibrina o *gel* di collagene arricchiti con diverse proteine della ECM (*Matrigel*) (43); inoltre, recenti studi hanno sfruttato la possibilità di utilizzare matrici biologiche decellularizzate come substrato di crescita delle cellule staminali adulte (44,45).

Per la rigenerazione cardiaca, mediante bioingegneria, la sfida principale è quella di riuscire a ricreare un tessuto, con dimensioni adeguate (con un'area di 10-50 cm<sup>2</sup> ed un spessore di alcuni mm), che rispecchi la stessa complessità riscontrata *in vivo*, con un'elevata densità cellulare, capace di integrarsi completamente con il tessuto ospite. Sebbene i primi studi in fase pre-clinica abbiano ottenuto risultati incoraggianti, sono stati effettuati pochi *trials* e non è possibile definire l'applicabilità clinica, la sicurezza e l'efficacia di tale trattamento, che costituisce, comunque, una strategia abbastanza invasiva per il paziente.

Per tale motivo è stata rivolta l'attenzione allo studio di matrici iniettabili che, in combinazione con le cellule staminali, sono capaci di ricreare *in situ* l'ECM, facilitando l'attecchimento e la migrazione cellulare e, allo stesso tempo, la neoangiogenesi nel miocardio post-ischemico (46).

## **2. SCOPO DELLO STUDIO**

Il cuore umano adulto possiede una riserva di cellule staminali CD117 positive la cui funzione è quella di supportare l'omeostasi tissutale. Recenti evidenze hanno dimostrato che il numero delle cellule CD117(+) aumenta nel mio miocardio post-ischemico; tuttavia, nonostante tale incremento le cellule staminali attivate non riescono a supportare la rigenerazione tissutale, contribuendo all'instaurarsi dello scompenso cardiaco. Inoltre, tra i diversi fattori che portano all'insufficienza cardiaca post-ischemica, anche la variazione della struttura dell'ECM, e quindi il rimodellamento ventricolare, si oppongono alla rigenerazione miocardica. In particolare, è stato dimostrato che le variazioni nell'espressione delle proteine dell'ECM, come ad esempio la diminuzione della laminina, trasmettono segnali che inducono alterazioni metaboliche e strutturali, responsabili dell'apoptosi cellulare.

Sulla base di tali premesse risulta particolarmente interessante studiare come tali fattori possano interagire tra loro nel riparo tissutale.

L'obiettivo di questo lavoro è stato di confrontare le potenzialità proliferative e differenziative delle cellule primitive cardiache CD117(+) isolate da cuori umani adulti normali e post-ischemici. Inoltre è stata studiata la composizione proteica della ECM (*cardiogel*) ottenuta *in vitro* dai fibroblasti cardiaci isolati da cuori umani adulti normali e da cuori espianati per insufficienza cardiaca post-ischemica. Contemporaneamente sono stati analizzati gli effetti delle interazioni delle cellule primitive cardiache, normali e patologiche, con le singole proteine della ECM e con il *cardiogel*, normale e patologico, al fine di definire la popolazione cellulare ed il microambiente ottimali per la rigenerazione cardiaca.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1. ISOLAMENTO E COLTURA DELLE CELLULE PRIMITIVE CARDIACHE**

##### **3.1.1. ALLESTIMENTO DELLA COLTURA PRIMARIA**

Le cellule primitive cardiache sono state isolate da frammenti di atrio di 20 cuori umani (14 maschi e 6 femmine con età media di  $56 \pm 5,5$  anni e frazione di eiezione media di  $25 \pm 1\%$ ) espantati per insufficienza cardiaca associata a cardiomiopatia ischemica, e da frammenti di atrio di 11 cuori normali (6 maschi e 5 femmine con età media di  $35 \pm 12$  anni) di pazienti deceduti per cause non cardiovascolari.

La coltura primaria è stata ottenuta come descritto in *Freshney RI. "Culture of animal cells" (47)*, con opportune modifiche. Brevemente, i frammenti tissutali sono stati sminuzzati e successivamente digeriti incubandoli con tripsina-EDTA allo 0,25% e collagenasi II (Sigma-Aldrich, USA) allo 0,1% (w/v). I cardiomiociti sono stati rimossi mediante centrifugazione a bassa velocità, e, successivamente, il sovrinatante è stato fatto passare attraverso filtri di 40  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, USA). Le cellule così ottenute sono state piastrate alla densità di  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  in *DMEM-Ham F12 medium* (Sigma-Aldrich) arricchito con siero fetale bovino al 5% (Invitrogen, USA), glutatione (0,2 mM, Sigma-Aldrich), penicillina G (50.000 U) e streptomina (50 mg, Invitrogen, USA); le cellule sono state lasciate proliferare.

##### **3.1.2. ISOLAMENTO DEI FIBROBLASTI E DELLE CELLULE CD117(+)**

Una volta raggiunta la confluenza di circa il 75%, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA allo 0,25% e, sono stati isolati i fibroblasti e le cellule CD117(+). I fibroblasti sono stati isolati mediante l'applicazione di una selezione immunomagnetica positiva, utilizzando anticorpi specifici per i fibroblasti coniugati a particelle magnetiche (Miltenyi Biotec, Germany). Più precisamente le cellule sono state dapprima incubate con un anticorpo monoclonale diretto contro i fibroblasti (1:5) e con l'*FcR blocking reagent* (1:5), per evitare legami aspecifici dell'anticorpo. Successivamente, la sospensione cellulare è stata caricata all'interno di una colonnina posta, a sua volta, in un campo magnetico. Il risultato è stato l'eluizione della frazione negativa, ed il trattenimento, all'interno della colonnina, dei fibroblasti. Questi ultimi sono stati raccolti rimuovendo la colonnina dal campo

magnetico. Allo stesso modo, le cellule CD117(+) sono state purificate dalla frazione cellulare priva di fibroblasti mediante una selezione positiva immunomagnetica, utilizzando anticorpi per CD117 coniugati a particelle magnetiche. L'efficacia della separazione delle cellule CD117(+) è stata confermata mediante immunofluorescenza.

### 3.2 PRODUZIONE CARDIOGEL

Il *cardiogel* è una matrice proteica naturale ottenuta mediante la coltura di fibroblasti cardiaci, isolati sia da cuori normali che da espunti di cuori umani adulti. I fibroblasti, isolati attraverso selezione immunomagnetica, sono stati messi in coltura, alla densità di 50.000 cellule/cm<sup>2</sup>, in DMEM arricchito con siero fetale bovino al 10%, penicillina G (50.000 U) e streptomina (50 mg); i fibroblasti sono stati lasciati in confluenza per circa 10 giorni, un tempo sufficiente per la produzione di un'abbondante matrice (48,49).

#### 3.2.1 IMMUNOFLUORESCENZA

Le piastre contenenti il *cardiogel* sono state fissate per 20 min a temperatura ambiente con paraformaldeide al 4%. In seguito, le piastre sono state lavate in PBS 1X, incubate con siero di asino al 10% per 30 min a temperatura ambiente, ed incubate per un'ora a 37°C con specifici anticorpi primari. Sono stati usati anticorpi primari per il riconoscimento di:

- Fibronectina (anticorpo policlonale, Chemicon Int, USA)
- Tenascina (anticorpo monoclonale, Sigma-Aldrich)
- Collagene I (anticorpo monoclonale, Sigma-Aldrich)
- Collagene III (anticorpo monoclonale, Sigma-Aldrich)
- Collagene IV (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Laminina (anticorpo policlonale di topo, Santa Cruz Biotec)

Successivamente le piastre sono state lavate in PBS 1X, per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario, ed incubate per un'ora a 37°C con gli anticorpi secondari, IgG o IgM, diretti contro le specie in cui sono stati sviluppati gli anticorpi primari usati, coniugati con rodamina o fluoresceina (Jackson ImmunoResearch, UK). I campi colorati sono stati coperti con vetrini coprioggetto montati su *Vectashield* (Vector Labs, USA). Il *cardiogel*, quindi, è stato osservato con un microscopio Leica

DMLB equipaggiato per l'epifluorescenza e connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica DC200.

### 3.2.2 IMMUNOBLOTTING

I fibroblasti derivati dai cuori normali e dai cuori post-ischemici, insieme alla matrice naturale da essi prodotta, sono stati staccati mediante *scraping* in PBS 1X e gli estratti proteici sono stati ottenuti mediante incubazione in *lysis buffer* contenente 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 250 mM NaCl, e 0.1% Triton X-100 arricchito degli inibitori delle proteasi (1 mM DTT, 2 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinina e 10 µg/ml leupeptina). La concentrazione proteica è stata determinata mediante il *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); 30 µg di ciascun campione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di SDS-poliacrilammide al 6%; successivamente le bande proteiche sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories) mediante *elettro-blotting*. Le membrane sono state bloccate ed incubate con anticorpi primari diretti contro:

- fibronectina (anticorpo policlonale, Sigma-Aldrich)
- tenascina-X (anticorpo monoclonale, Sigma-Aldrich)
- tenascina-C (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- collagene I (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- laminina-1 (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- laminina-2 (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- $\alpha$ -actinina (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)

Dopo il lavaggio delle membrane, queste sono state incubate con anticorpi secondari IgG, coniugati alla perossidasi di rafano (Santa Cruz Biotec), diretti contro le specie in cui sono stati sviluppati gli anticorpi primari. Per rilevare i complessi antigene-anticorpo le membrane sono state immerse in una soluzione del substrato chemiluminescente (Amersham Biosciences, UK) ed analizzate mediante autoradiografia. L'intensità di ciascuna banda è stata determinata mediante l'utilizzo del software ImageJ (NIH, USA).

### 3.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA NELLE CELLULE CD117 (+)

Il profilo di espressione genica delle cellule CD117(+), normali e patologiche, è stato analizzato mediante l'utilizzo di un "PIQOR Stem Cell Microarray" (Miltenyi Biotec, France), comprendente 936 geni coinvolti nella biologia e nel differenziamento delle cellule staminali, per identificare geni diversamente espressi nei due tipi cellulari.

Il servizio Miltenyi ha provveduto all'estrazione cellulare dell'RNA, alla sua amplificazione (sfruttando il sistema della polimerasi T7), alla marcatura dei trascritti, all'ibridazione sui *chips* e all'analisi dei dati di fluorescenza. Ciascun *chip* è stato ibridato sia con l'RNA derivato dalle cellule normali (marcato con Cy3), sia con l'RNA estratto dalle cellule patologiche (marcato con Cy5). Le variazioni di espressione sono state indicate come il rapporto delle intensità dei segnali di fluorescenza tra i campioni patologici e normali (P/N). L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il *Gene Functional Classification Tool* disponibile presso il database bioinformatico "DAVID" (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*; Nature Protoc. 2009;4(1):44-57).

### 3.4 IMMUNOFLUORESCENZA SULLE CELLULE CD117(+)

Per la caratterizzazione fenotipica *in vitro*, le cellule CD117(+), derivate da cuori umani adulti normali ed espianati per insufficienza cardiaca post-ischemica, sono state sottoposte a colorazioni volte ad identificare specifici marcatori di membrana ed antigeni citoplasmatici e nucleari.

Sono stati usati anticorpi primari per il riconoscimento di:

- CD117 (anticorpo policlonale, Dako Cytomation, Denmark)
- Nkx 2.5 (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- actina  $\alpha$ -sarcomerica (anticorpo monoclonale, Sigma-Aldrich)
- catena pesante della miosina ventricolare (anticorpo policlonale, Chemicon Int)
- Ets-1 (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- VEGFR-2 (Flk-1/KDR, anticorpo monoclonale, Santa Cruz Biotec)
- fattore VIII (anticorpo policlonale, Sigma-Aldrich)
- GATA-6 (anticorpo policlonale, Santa Cruz Biotec)
- actina del muscolo liscio (anticorpo monoclonale, Sigma-Aldrich)
- Ki67 (anticorpo policlonale, Novo Castra, UK)

- Notch (anticorpo monoclonale, Abcam, UK)

Per la rivelazione degli antigeni sono stati utilizzati anticorpi secondari, diretti contro le specie in cui sono stati sviluppati gli anticorpi primari, coniugati con la fluoresceina o la rodamina (Jackson Immunoresearch).

I nuclei sono stati visualizzati con DAPI, un colorante nucleare specifico, incubando le cellule per 15 min a temperatura ambiente. Le cellule, quindi, sono state osservate con un microscopio a fluorescenza.

### 3.5 COLTURE DELLE CELLULE PRIMITIVE CARDIACHE SULLE PROTEINE DELLA ECM E SUL CARDIOGEL

Per valutare gli effetti delle proteine dell'ECM sull'apoptosi e la proliferazione delle cellule CD117(+), isolate dai cuori umani adulti normali e post-ischemici, queste sono state piastrate alla densità di  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  su *chamber slides* (BD Bioscience, USA) rivestite con:

- laminina-1 (R&D Systems, USA)
- laminina-2 (Sigma-Aldrich)
- fibronectina (Santa Cruz Biotech)
- collagene IV (Santa Cruz Biotech)
- *cardiogel*
- albumina di siero bovino (BSA) (MP Biomedicals, LLC, Germany)

Le proteine della ECM sono state fatte aderire alle piastre di coltura nella quantità di  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; le cellule CD117(+) sono state messe in coltura sul *cardiogel*, normale e patologico, dopo aver rimosso i fibroblasti, attraverso un metodo non enzimatico, con EDTA 0.5 mM (Sigma-Aldrich).

L'albumina, invece, è stata utilizzata come controllo.

#### 3.5.1. VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE

Per stimare il tasso proliferativo delle cellule CD117(+) sui diversi supporti proteici, le cellule quiescenti sono state tenute in coltura in mezzo completo per 24 ore, aggiungendo la 5-bromo-2'-deossi-uridina (BrdU,  $10 \mu\text{M}$ ) per un'ora prima di fissare le cellule. Il mezzo marcato con BrdU è stato rimosso, le cellule sono state lavate in PBS 1X e poi fissate in etanolo al 70% alla temperatura di  $-20^\circ\text{C}$  per 20 minuti. L'incorporazione di BrdU è stata stimata mediante l'utilizzo del "*BrdU Labeling and Detection kit*" (Roche Diagnostics, Germany).

Come indicato dal protocollo della ditta fornitrice, le cellule proliferanti sono state individuate incubandole prima con un anticorpo diretto contro BrdU (1:40), e, in un secondo momento, incubandole con un anticorpo secondario, coniugato con fluoresceina (1:40). La discriminazione dei nuclei è stata garantita mediante una colorazione specifica con DAPI. Le cellule positive sono state individuate mediante analisi con microscopio a fluorescenza.

### 3.5.2. VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

Per stimare l'indice di morte cellulare, le cellule CD117(+), in coltura sulle diverse proteine della matrice e sul *cardiogel*, normale e patologico, sono state fissate in paraformaldeide all'1%, dopo stimolazione con perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.2 mM per 12 ore.

Le cellule apoptotiche sono state marcate e identificate utilizzando “*ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit*” (Chemicon Int).

Le cellule sono state incubate in presenza di nucleotidi marcati con digoxigenina e in presenza dell'enzima deossinucleotidiltransferasi terminale (TdT). I nucleotidi incorporati sono stati rilevati mediante l'utilizzo di un anticorpo marcato con fluoresceina diretto contro la digoxigenina. La discriminazione dei nuclei è stata garantita mediante una colorazione specifica con DAPI.

Le cellule apoptotiche sono state identificate mediante microscopia a fluorescenza.

### 3.5.3 IMMUNOFLUORESCENZA PER LE CATENE INTEGRINICHE

L'analisi dell'espressione dei diversi recettori integrinici sulle cellule CD117(+), isolate da cuori umani adulti normali e post-ischemici, in coltura sul *cardiogel*, normale e patologico, è stata effettuata mediante immunofluorescenza. Sono stati utilizzati anticorpi diretti contro le seguenti proteine:

- integrina  $\alpha_1$  (anticorpo monoclonale, Chemicon Int, USA)
- integrina  $\alpha_2$  (anticorpo monoclonale, Chemicon Int)
- integrina  $\alpha_3$  (anticorpo monoclonale, Chemicon Int)
- integrina  $\alpha_4$  (anticorpo policlonale, Santa Cruz)
- integrina  $\alpha_6$  (anticorpo monoclonale, Chemicon Int)
- integrina  $\alpha_v$  (anticorpo policlonale, Santa Cruz)
- integrina  $\beta_1$  (anticorpo monoclonale, Chemicon International)

- integrina  $\beta_3$  (anticorpo monoclonale, Chemicon International)
- integrina  $\beta_4$  (anticorpo monoclonale, Chemicon International)

Per la rivelazione degli antigeni sono stati utilizzati anticorpi secondari, diretti contro le specie in cui sono stati sviluppati gli anticorpi primari, coniugati con la fluoresceina o la rodamina (Jackson Immunoresearch).

#### 3.5.4 BLOCCO DELL'ATTIVITA' DELLE INTEGRINE

Per il blocco delle integrine, sette gruppi di cellule primitive cardiache CD117(+) sono state incubate, in sospensione, per un'ora con anticorpi diretti verso specifiche catene integriniche. Tre gruppi sono stati incubati rispettivamente con anticorpi anti-integrina  $\alpha_2$  (40 $\mu$ g/ml per  $10^6$  cellule, Chemicon Int), anticorpi anti-integrina  $\alpha_6$  (40 $\mu$ g/ml per  $10^6$  cellule, Chemicon Int) o con anticorpi anti-integrina  $\beta_3$  (5 $\mu$ g/ml per  $10^6$  cellule, Chemicon Int). Tre gruppi, utilizzati come controllo, sono stati incubati con anticorpi aspecifici dello stesso isotipo di quelli utilizzati per il blocco delle integrine.

Infine, un ultimo gruppo controllo è stato processato allo stesso modo, ma senza alcun anticorpo. Successivamente ciascun gruppo di cellule è stato messo in coltura su piastre rivestite con *cardiogel* in mezzo senza siero per 12 ore.

#### 3.6 ANALISI STATISTICHE DEI DATI

L'analisi statistica dei dati provenienti dal confronto di due gruppi è stata effettuata mediante test-t Student, mentre per il confronto di gruppi multipli è stato utilizzato il t-test di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative con valori di  $p$  inferiori a 0,05.

## 4. RISULTATI

### 4.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE PRIMITIVE CARDIACHE

Le cellule primitive cardiache CD117(+) sono state isolate da cuori umani adulti normali e da cuori espianati per insufficienza cardiaca post-ischemica. La separazione delle cellule CD117(+), valutata mediante immunofluorescenza, ha mostrato un'efficienza del 98% (Fig. 1).

Lo studio dell'espressione dei geni coinvolti nella biologia delle cellule staminali è stato effettuato mediante il *PIQOR Stem Cell Microarray*; tale sistema ha permesso il confronto del trascrittoma delle CPC CD117(+), derivate da cuori normali e da cuori patologici. L'analisi è stata effettuata mediante l'applicazione del *Gene Functional Classification Tool* del *DAVID* ed è stata limitata ai geni per i quali la differenza di espressione, tra le condizioni normali e patologiche, era almeno di 1,7 volte. Tale studio ha evidenziato, nelle cellule staminali isolate da cuori con cardiomiopatia ischemica, una riduzione della multipotenzialità, il differenziamento verso le linee cellulari cardiache, l'attivazione della transizione epitelio-mesenchimale e, inoltre, un aumento dell'espressione dei geni inibitori della proliferazione e dei geni pro-apoptici (Fig. 2-3).

Il *commitment* differenziativo delle CPC CD117(+) derivate dai cuori normali e patologici è stato studiato anche mediante immunofluorescenza, identificando specifici fattori di trascrizione e marcatori citoplasmatici. L'espressione di Nkx2.5, GATA-6 o ETS-1 ha permesso di identificare i progenitori dei cardiomiociti, delle cellule muscolari lisce dei vasi e delle cellule endoteliali, mentre la presenza di proteine quali l'actina  $\alpha$ -sarcomerica, l'actina del muscolo liscio oppure FVIII ne ha identificato i precursori (Fig. 4).

La conta dei progenitori e dei precursori ha rivelato differenze significative tra le cellule derivate dai cuori normali e quelle derivate dai cuori espianati. Infatti, il numero dei progenitori di cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce dei vasi è risultato, rispettivamente, 4,9 volte ( $16,6 \pm 3,3$  vs  $3,35 \pm 1,45$ ), 2,7 volte ( $9,7 \pm 2,7$  vs  $3,62 \pm 0,3$ ) e 4,5 volte ( $20,57 \pm 5,9$  vs  $4,6 \pm 1,1$ ) maggiore nelle cellule CD117(+) patologiche rispetto alle cellule normali. Il numero dei precursori, cioè delle cellule negli stadi successivi del differenziamento è risultato, però, maggiore nei cuori normali ( $9,9 \pm 1,6$  vs  $8,49 \pm 3,09$  per i precursori dei cardiomiociti;  $6,08 \pm 0,33$  vs  $5,17 \pm 1,19$  per i precursori delle cellule endoteliali;  $6,6 \pm 0,4$  vs  $3,13 \pm 0,71$  per i precursori delle cellule muscolari

lisce). Nel complesso, il numero totale delle cellule primitive in via di differenziamento è risultato due volte maggiore nelle CPC derivate dai cuori patologici, rispetto alle cellule normali, confermando un aumento del *commitment* delle cellule CD117(+) verso le linee cellulari cardiache in condizioni patologiche (Fig. 5).

Lo studio della proliferazione è stato condotto mediante la valutazione dell'incorporazione di BrdU durante la replicazione del DNA. Le cellule CD117(+) derivate dai cuori patologici proliferano  $3,2 \pm 0,7$  volte di più ( $p < 0,05$ ) rispetto alle cellule isolate dai cuori normali (Fig.6-A). L'apoptosi, indotta dallo stress ossidativo, invece, è risultata  $1,8 \pm 0,2$  volte più alta ( $p < 0,05$ ) nelle cellule CD117(+) patologiche, rispetto alle cellule normali (Fig.6-B).

Data l'attivazione della proliferazione e del differenziamento nelle cellule cardiache primitive derivate dai cuori post-ischemici, è stata analizzata la distribuzione di Notch nelle cellule in ciclo, Ki67(+). Ciò ha permesso di identificare il tipo di divisione nella popolazione cellulare CD117(+). Nelle cellule patologiche, la divisione asimmetrica, con la formazione di una cellula staminale Notch(+) e una cellula indirizzata verso il differenziamento, è di circa due volte più frequente rispetto alla divisione asimmetrica. Invece, nelle CPC normali la divisione asimmetrica così come quella simmetrica, con la generazione di due cellule staminali figlie, sono state riscontrate in ugual misura (Fig. 7).

#### 4.2 VALUTAZIONE DELL'INFLUENZA DELLE PROTEINE DELL'ECM SULLA BIOLOGIA DELLE CPC

Le cellule primitive cardiache CD117(+), isolate da cuori normali, sono state messe in coltura in presenza di diverse proteine della matrice extracellulare, quali la laminina-1, la laminina-2, la fibronectina e il collagene I, mentre l'albumina è stata utilizzata come controllo.

L'incorporazione di BrdU nelle CPC è stata dell' $4,8\% \pm 0,8$  in presenza della BSA, del  $28,1\% \pm 5,8$  in presenza di laminina-1, del  $7,7\% \pm 1,3$  in presenza di laminina-2, del  $19,86\% \pm 2,1$  in presenza di fibronectina e del  $12,2\% \pm 1,9$  in presenza del collagene I (Fig.8-A). L'apoptosi ha raggiunto il  $14,6\% \pm 2,67$  in presenza della BSA, ed è diminuita in presenza delle altre proteine dell'ECM ( $1,3\% \pm 0,6$  sulla laminina-1;  $4,4\% \pm 0,8$  sulla laminina-2;  $10,56\% \pm 1,83$  sulla fibronectina;  $10,72\% \pm 1,72$  sul collagene I) (Fig. 8-B).

### 4.3 CARATTERIZZAZIONE DEL CARDIOGEL ED EFFETTI SULLE CPC IN CONDIZIONI NORMALI E PATOLOGICHE

Il *cardiogel* è una matrice naturale prodotta *in vitro* dai fibroblasti cardiaci, derivati da cuori umani adulti normali e post-ischemici, al fine di ricreare un microambiente il più possibile simile a quello riscontrato in vivo.

La composizione proteica del *cardiogel* è stata dapprima esaminata mediante immunofluorescenza, ed è risultata simile dal punto di vista qualitativo nelle due matrici, normale e patologica. Il *cardiogel*, infatti, è costituito da diverse proteine dell'ECM quali fibronectina, collagene (tipi I, III, IV), tenascina e laminina (Fig. 9).

L'analisi proteica del *cardiogel*, mediante *immunoblotting*, ha evidenziato differenze più significative nella quantità delle proteine presenti nei due tipi di matrici. Infatti, nel *cardiogel* patologico è stata riscontrata la presenza di Tenascina X (assente nella matrice ottenuta dai fibroblasti normali) e un'espressione maggiore di laminina-1 e collagene I, rispetto al *cardiogel* normale, mentre la laminina-2 e la fibronectina sono espresse ad alti livelli sia in condizioni normali che patologiche (Fig. 10).

Sono state, quindi, valutate la proliferazione e l'apoptosi in presenza della matrice naturale, per valutare gli effetti del *cardiogel* normale e patologico sulle CPC CD117(+) isolate dai cuori umani adulti normali e post-ischemici. In particolare, per quel che riguarda le cellule derivate dai cuori normali, la frazione di cellule in proliferazione ha raggiunto l'11,8%±0,85 nelle condizioni di controllo, ed è aumentata fino al 24,21%±4,58 e al 24,17%±3,79 in presenza del *cardiogel* normale e patologico, rispettivamente (Fig.11-A). L'apoptosi è stata riscontrata nell'1,33%±0,04 delle cellule controllo, ed è risultata pressoché invariata sia in presenza del *cardiogel* normale che patologico ( $p>0,05$ ) (Fig.11-C).

Nelle cellule CD117(+) isolate dai cuori post-ischemici, la proliferazione è stata del 14,6%±1,41 nel gruppo controllo, mentre ha raggiunto l'17,13%±1,42 e il 22,9%±1,21 in presenza del *cardiogel* normale e patologico, rispettivamente (Fig.11-B). I livelli di apoptosi sono stati dell'2,73%±0,23 nelle condizioni controllo, mentre sono diminuiti in presenza del *cardiogel* normale e patologico, raggiungendo valori pari all'1,73%±0,03 e all'1,35%±0,15, rispettivamente (Fig.11-D).

#### 4.5 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE INTEGRINE SULLE CPC IN COLTURA SUL CARDIOGEL

L'espressione delle integrine, recettori cellulari che mediano le interazioni cellula-matrice e sono responsabili della trasduzione di numerosi *pathways* cellulari, è stata analizzata mediante immunofluorescenza. In particolare le cellule primitive cardiache CD117(+), isolate da cuori normali, in coltura sul *cardiogel* normale esprimono livelli elevati di integrina  $\beta_3$  (Fig.12-C), mentre lo stesso tipo cellulare in coltura sul *cardiogel* patologico esprime prevalentemente le integrine  $\alpha_2$  e  $\alpha_6$  (Fig. 12-A,B). Le CPC derivate da cuori post-ischemici in coltura sul *cardiogel* normale esprimono maggiormente l'integrina  $\alpha_2$ , mentre in presenza del *cardiogel* patologico prevalgono le integrine  $\alpha_4$  e  $\alpha_6$ .

Allo scopo di valutare il ruolo delle integrine maggiormente espresse in condizioni normali e patologiche, sono stati esaminati gli effetti del blocco dell'attività di tali recettori sulla proliferazione e sull'apoptosi delle cellule primitive cardiache CD117(+). Tale studio ha evidenziato che il blocco dell'integrina  $\alpha_2$  induce una riduzione della proliferazione ed un aumento della morte apoptotica; dal blocco selettivo dell'integrina  $\alpha_6$ , invece, è risultato che tale integrina è coinvolta nella protezione dall'apoptosi, mentre non interviene nella regolazione della proliferazione; al contrario il blocco dell'integrina  $\beta_3$  rivela il coinvolgimento di tale recettore prevalentemente nella regolazione della proliferazione ma non nella protezione dall'apoptosi (Fig. 14-A,B).

## 5. DISCUSSIONE

Come ormai riportato da numerosi articoli presenti in letteratura, l'attivazione delle cellule staminali cardiache è un evento che si verifica in seguito a diversi insulti a livello del miocardio, quali l'infarto o la stenosi aortica cronica (2,5). Perciò, il punto di partenza di questo lavoro è stato il confronto delle cellule CD117(+) isolate da cuori umani adulti normali e da cuori umani negli stadi terminali dell'insufficienza cardiaca post-ischemica. Tale confronto ha messo in evidenza importanti differenze circa il potenziale differenziativo e proliferativo nelle CPC normali e patologiche.

Le cellule primitive cardiache CD117(+) derivate dai cuori con cardiomiopatia post-ischemica, infatti, presentano una perdita della multipotenzialità, rispetto alle cellule derivate dai cuori sani, e sono maggiormente indirizzate verso le linee cellulari cardiache. Esse, infatti, presentano una maggiore espressione dei geni coinvolti nello sviluppo cardiocircolatorio, e sono in grado, *in vitro*, di dare origine ad un numero maggiore di progenitori di cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce dei vasi. Inoltre, la maggiore attivazione delle CPC patologiche è stata ulteriormente confermata dalla scoperta dell'attivazione del *pathway* del TGF $\beta$ , principale induttore della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) che recentemente è stata proposta come meccanismo alla base dell'origine, dall'epicardio, di cellule staminali CD117(+) (50). Inoltre le CPC patologiche proliferano di più, rispetto alle cellule normali, dividendosi prevalentemente secondo un meccanismo di tipo asimmetrico, come confermato dalla diversa distribuzione di Notch nelle cellule figlie originate dalla divisione mitotica delle cellule CD117(+). Notch è un recettore transmembrana che interagisce con ligandi espressi sulla parete di cellule adiacenti, attivando così una via di trasduzione del segnale ben conservata che svolge un ruolo importante sia nelle cellule staminali embrionali che in quelle adulte. Ad oggi infatti, sono molti gli studi in letteratura che dimostrano il coinvolgimento di Notch nella regolazione di molteplici processi, come la determinazione del destino di una cellula, la regolazione spazio-temporale della proliferazione, del differenziamento e dell'apoptosi in cellule derivanti da tessuti differenti (51).

Tuttavia, sebbene le CPC patologiche possano dare origine ad un numero maggiore di progenitori, il numero dei precursori di cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, è maggiore nel

cuore sano, indicando l'incapacità delle CPC patologiche di portare a termine il processo differenziativo. Infatti, tali cellule sono più suscettibili all'apoptosi, in quanto mostrano un'aumentata espressione di geni pro-apoptotici e resistono meno alla morte cellulare programmata indotta dallo stress ossidativo. Per tale motivo, prima di passare ad un approccio di terapia cellulare, per la rigenerazione del miocardio post-ischemico utilizzando le cellule primitive cardiache CD117(+), è necessario comprendere i meccanismi responsabili di tale difetto cellulare; inoltre non deve essere sottovalutata l'influenza del microambiente nel determinare il destino cellulare.

La formazione e l'omeostasi di un tessuto sono garantite da un'interazione dinamica tra le cellule che lo compongono e il loro microambiente, che risulta costituito sostanzialmente dalla matrice extracellulare (52). A tale scopo è stata analizzata la composizione di una matrice naturale, il *cardiogel*, prodotta *in vitro* dai fibroblasti isolati da cuori umani adulti normali e post-ischemici, e, successivamente, è stato studiato il comportamento delle CPC normali e patologiche, sia sulle singole componenti proteiche dell'ECM, sia sul *cardiogel* normale e patologico. Il *cardiogel* ha una composizione abbastanza omogenea, dal punto di vista qualitativo, sia nelle condizioni normali che patologiche; la matrice patologica, tuttavia, esprime una maggiore quantità di laminina-1 e la tenascina-X (assente nella matrice normale). Queste proteine generalmente sono assenti nel miocardio adulto normale; la loro espressione nel cuore post-ischemico è associata all'attivazione di un programma genico tipico dello sviluppo embrionale, che sarebbe finalizzato a sostenere il processo rigenerativo (27).

Dallo studio sulla proliferazione e l'apoptosi delle cellule CPC in coltura sul *cardiogel* è emerso che, per quel che riguarda il comportamento delle cellule derivate dai cuori normali, la matrice naturale, sia normale che patologica, stimola la proliferazione delle cellule primitive cardiache, mentre il *cardiogel* patologico esercita un maggior effetto anti-apoptotico rispetto al *cardiogel* normale. Le cellule CD117(+) isolate dai cuori post-ischemici, d'altra parte, risentono della differente composizione della matrice e, infatti, rispetto al *cardiogel* normale, è stato osservato un maggiore aumento del tasso di proliferazione ed una più significativa riduzione del livello di apoptosi in presenza della matrice prodotta dai fibroblasti derivati dai cuori patologici.

Gli studi condotti sulle singole proteine della matrice extracellulare mostrano un maggiore coinvolgimento della laminina-1 nella mediazione degli effetti sulla stimolazione della proliferazione, e della laminina-1 e -2 nella protezione dall'apoptosi. Infatti, *in vivo*, la laminina-1 è la prima proteina ad essere espressa durante lo sviluppo embrionale del cuore, e in sua assenza tale sviluppo non può essere portato a termine (53). Numerosi dati presenti in letteratura, inoltre, hanno dimostrato che l'assenza della laminina-2, indebolendo la membrana basale delle cellule, danneggia le fibre muscolari che non riescono a far fronte allo stress derivato dalla contrazione muscolare (54). Quindi, l'aumentata espressione della laminina-1 nella matrice derivata dal cuore post-ischemico riflette la funzione di tale proteina nel sostenere la formazione di nuove cellule funzionalmente competenti; invece, la laminina-2, che è espressa ad elevati livelli sia nel *cardiogel* normale che patologico, esplicando una funzione prevalentemente strutturale, interviene nel mantenimento delle cellule preesistenti del miocardio.

La capacità di percepire e rispondere ai cambiamenti del microambiente extracellulare è garantita da recettori cellulari. Le integrine sono i principali recettori responsabili delle interazioni matrice extracellulare-cellule, e, nonostante siano proteine prive di attività enzimatica, intervengono in numerose vie di segnalazione. Il profilo di espressione delle integrine è specifico per un dato tipo cellulare, tuttavia esso può variare a seconda dei cambiamenti del microambiente (15,16). A tale proposito è stata valutata l'espressione delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  delle integrine sulle cellule primitive cardiache in coltura sul *cardiogel* ottenuto da fibroblasti isolati da cuori normali e quello derivato dai fibroblasti isolati dai cuori espiantati con cardiomiopatia post-ischemica allo stadio terminale. In particolare le cellule primitive cardiache in coltura sul *cardiogel* patologico esprimono elevati livelli di integrina  $\alpha_2$  e  $\alpha_6$ , mentre in presenza del *cardiogel* normale prevale l'integrina  $\beta_3$ .

Dal blocco dell'attività di ciascuna catena integrinica è stato osservato che l'integrina  $\alpha_2$  è coinvolta nella stimolazione della proliferazione delle cellule primitive cardiache e nella protezione dalla morte apoptotica. Tale integrina, in associazione con la catena  $\beta_1$ , media le interazioni cellulari con il collagene I, IV e con la laminina-1; la sua espressione è stata riscontrata in cellule staminali che sostengono l'emopoiesi (55). L'integrina  $\alpha_6$ , invece, è implicata nella protezione delle CPC CD117(+) dall'apoptosi senza influenzarne, in modo significativo, la proliferazione. L'integrina  $\alpha_6$

è stata descritta come una proteina tipica dello sviluppo embrionale, coinvolta nel differenziamento cellulare (56); inoltre recentemente sono stati riscontrati elevati livelli di espressione dell'integrina  $\alpha_6$  in diversi tipi cellulari, anche nella vita post-natale, in cui sarebbe coinvolta nella migrazione cellulare interagendo con la laminina-1 (57). L'integrina  $\beta_3$ , espressa prevalentemente in presenza del *cardiogel* normale, è implicata nella stimolazione della proliferazione cellulare, senza interferire con i livelli di morte apoptotica. Tale risultato è in accordo con i dati presenti in letteratura che vedono coinvolta l'integrina  $\alpha_v\beta_3$  nell'adesione e nella stimolazione della proliferazione cellulare (58).

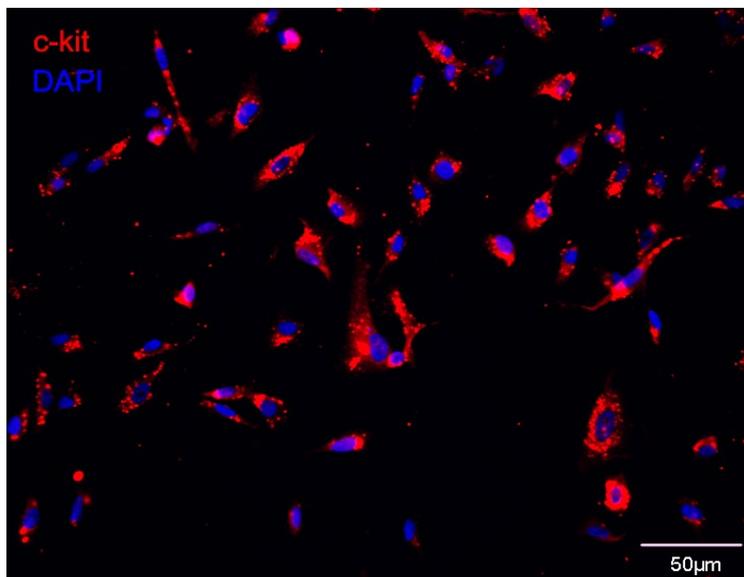
Quindi, dai risultati del presente studio è evidente che la composizione proteica del *cardiogel* patologico è quella che meglio supporta la biologia delle cellule primitive cardiache in condizioni patologiche. Il rimodellamento cardiaco, che si verifica in seguito all'infarto del miocardio, inizialmente è un fenomeno adattativo, in cui la variazione nella composizione delle proteine della matrice extracellulare ha lo scopo sia di garantire una maggiore resistenza alla parete ventricolare, sia di sostenere il processo riparativo (29,59). *In vivo*, però, le CPC residenti, nonostante la loro attivazione, non riescono a supportare la rigenerazione del miocardio danneggiato: l'attivazione della rigenerazione cardiaca nelle condizioni patologiche si manifesta con la stimolazione della proliferazione dei progenitori cardiaci e con l'aumento dell'espressione delle proteine citoplasmatiche nei precursori che però vanno incontro ad apoptosi. È, pertanto, evidente che nello studio della rigenerazione cardiaca debbano essere prese in considerazione anche altre componenti e, nella ricerca dei fattori che alterano il microambiente cardiaco compromettendo le potenzialità rigenerative del cuore, un *target* da non sottovalutare potrebbe essere lo stress ossidativo che, attivando *pathway* apoptotici, impedirebbe il reclutamento delle cellule primitive cardiache nel sito di danno (60).

In conclusione, l'utilizzo di matrici biologiche qualitativamente e quantitativamente simili alla matrice extracellulare cardiaca riscontrabile *in vivo* quale substrato per la coltura delle cellule cardiache primitive ci ha permesso di ottenere informazioni importanti riguardanti la biologia di tali cellule e le interazioni cellula-matrice. Siccome la composizione della matrice extracellulare subisce dei profondi cambiamenti durante il rimodellamento cardiaco in seguito all'ischemia, è stato

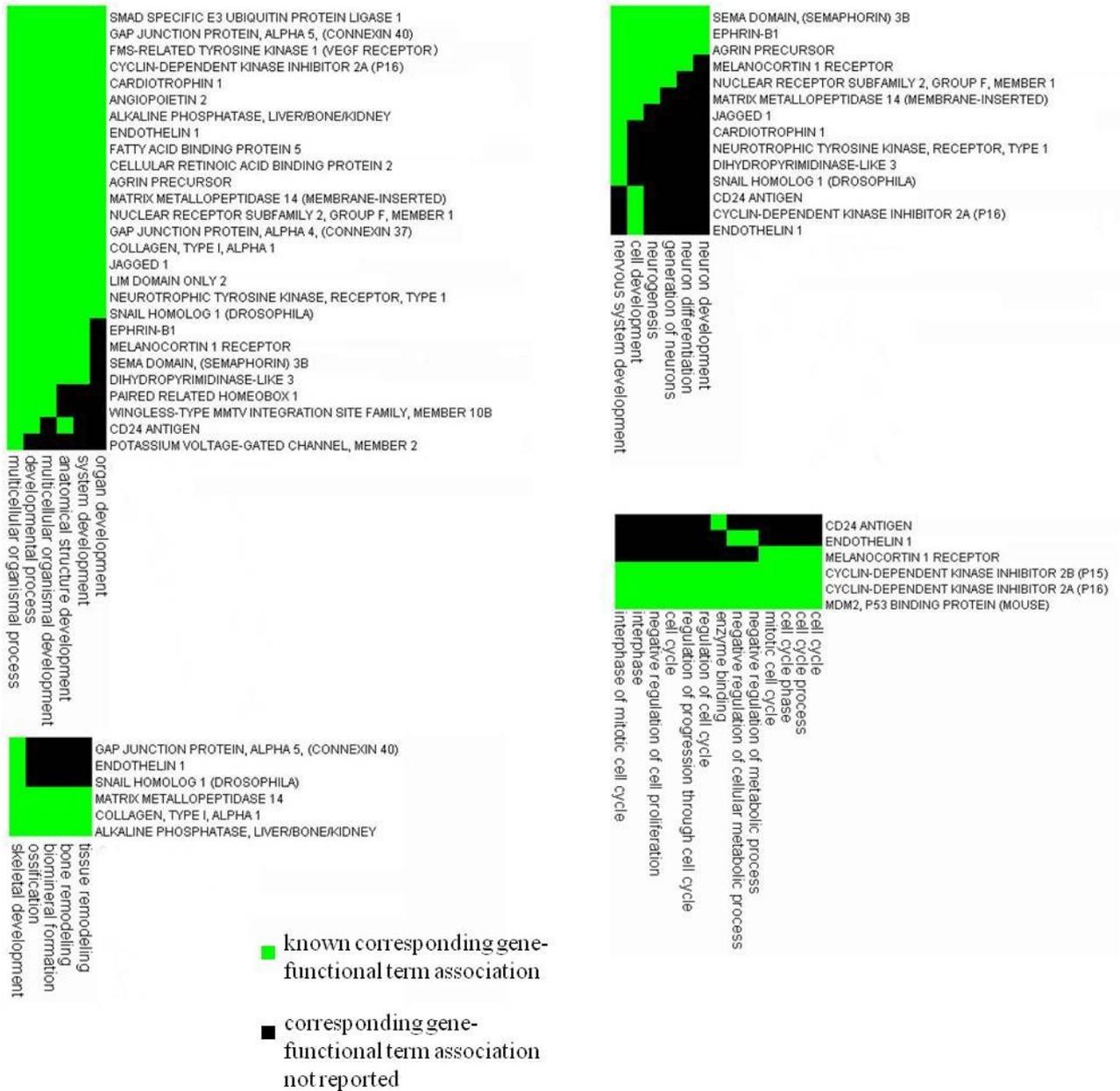
possibile valutare come i cambiamenti avvenuti durante la progressione della cardiomiopatia ischemica influenzano le cellule cardiache primitive residenti, e quindi il potenziale rigenerativo del cuore umano adulto. Tali conoscenze, insieme alla determinazione della composizione della matrice normale e patologica, hanno portato all'identificazione delle componenti della matrice ad alto impatto biologico e, negli studi futuri, potrebbero portare all'aggiunta di esse (o di frammenti di esse) agli *scaffold* utilizzati nella bioingegneria per la rigenerazione del tessuto cardiaco. A tal proposito, appare importante il ruolo svolto dalla laminina-1 nella stimolazione e nella protezione delle cellule cardiache staminali e primitive. Ciò potrebbe essere il punto di partenza per lo sviluppo di nuove strategie di bioingegneria tissutale che, sfruttando gli stessi fattori che intervengono nel rimodellamento cardiaco, potrebbero manipolare in modo più prevedibile le risposte cellulari, garantendo un microambiente più adatto all'integrazione e alla sopravvivenza cellulare a lungo termine, sia *in vitro* che in seguito all'impianto *in vivo*.

Dal momento che l'espressione di specifiche integrine è correlata alla presenza e alla quantità di specifiche componenti della matrice extracellulare, non sorprende che le cellule cardiache primitive coltivate in presenza della biomatrice normale e patologica differiscano nell'espressione delle integrine. Perciò l'identificazione di specifici segnali mediati dalle integrine, fondamentali per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule cardiache primitive, effettuata nel presente studio, potrebbe portare ad un ulteriore miglioramento della definizione della composizione ottimale della matrice per la stimolazione della rigenerazione cardiaca mediante l'applicazione dell'ingegneria tissutale; inoltre, ciò dovrebbe permettere di superare un importante limite degli *scaffold* che possono essere integrati solo con le proteine di basso peso molecolare, dal momento che la bioingegneria tissutale potrà servirsi di quegli specifici frammenti di proteine della matrice che costituiscono i ligandi per le specifiche integrine.

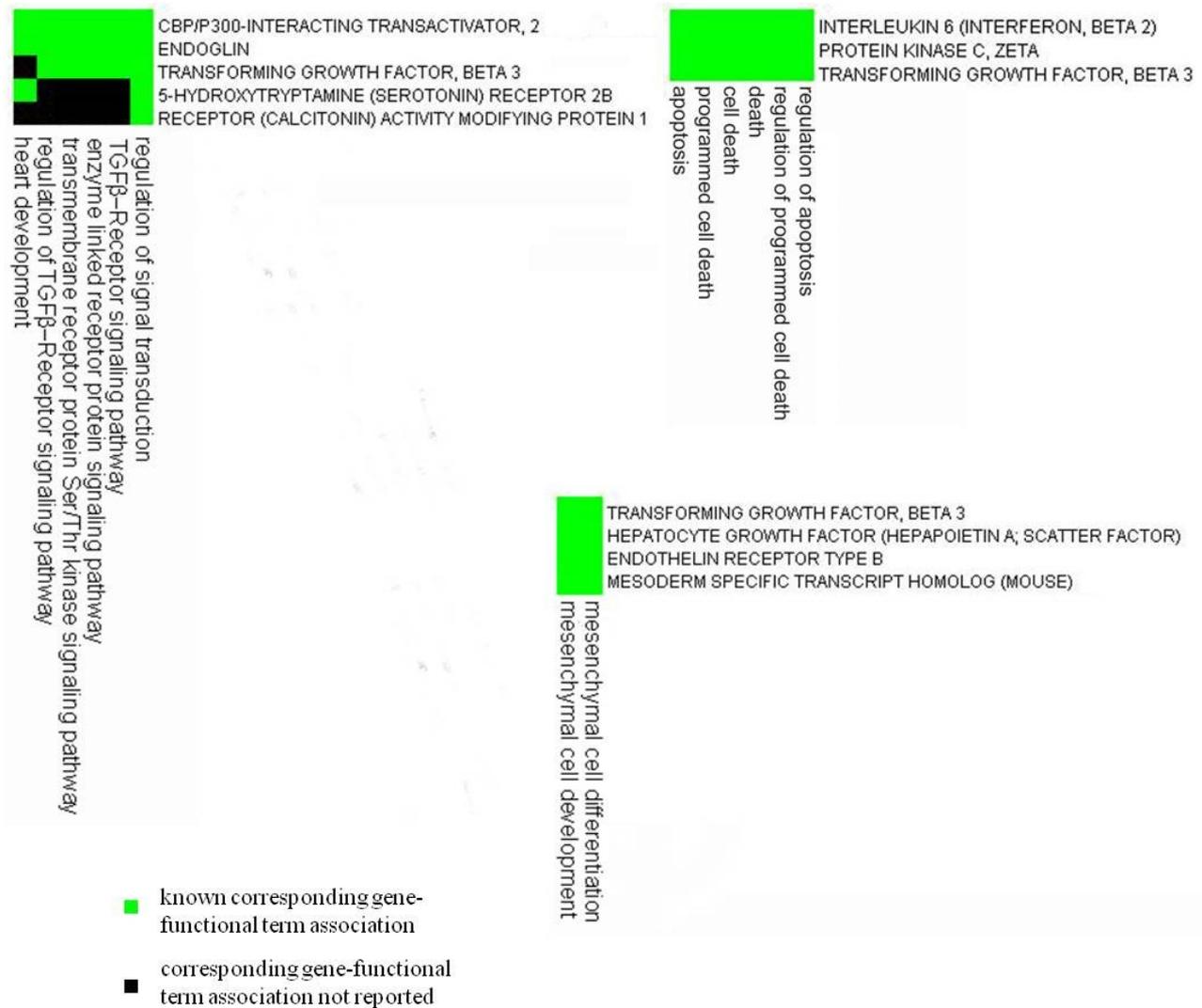
## 6. ICONOGRAFIA



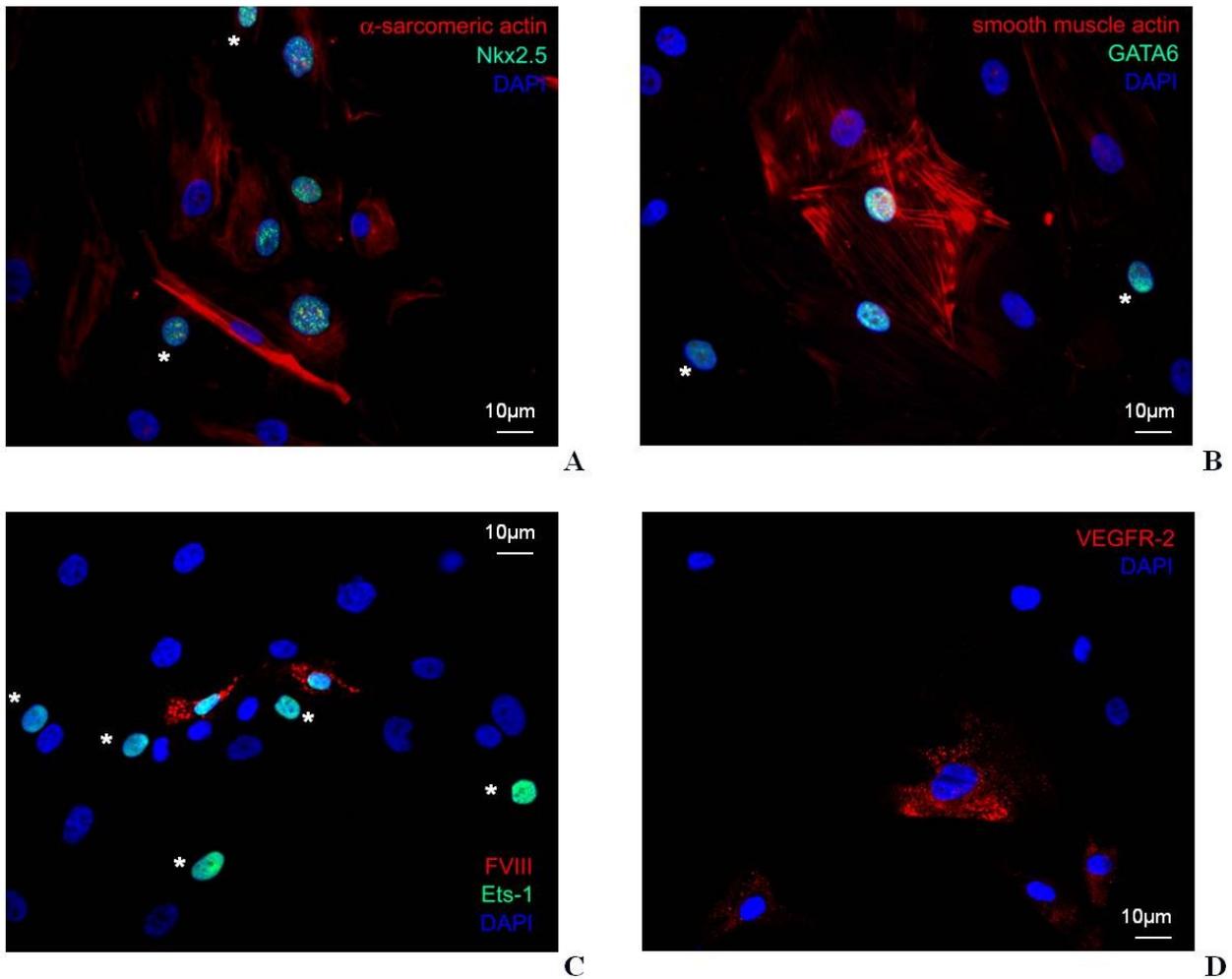
**Figura 1.** Immagine di immunofluorescenza rappresentativa delle cellule primitive cardiache CD117(+). Le CPC sono state isolate dalla digestione enzimatica di frammenti di atrio derivati da cuori umani adulti normali e da cuori umani espianati per insufficienza cardiaca post-ischemica; la frazione cellulare CD117(+) è stata purificata mediante selezione positiva immunomagnetica. L'efficacia della separazione ha raggiunto il 98%.



**Figura 2.** Heatmaps derivate dall’analisi, mediante il “*Gene Functional Classification Tool*” del DAVID, dei dati di espressione genica derivati dal PIQOR *Sem Cell Microarray*. Rappresentazione dei geni down-regolati nelle cellule primitive cardiache CD117(+) isolate dai cuori post-ischemici.

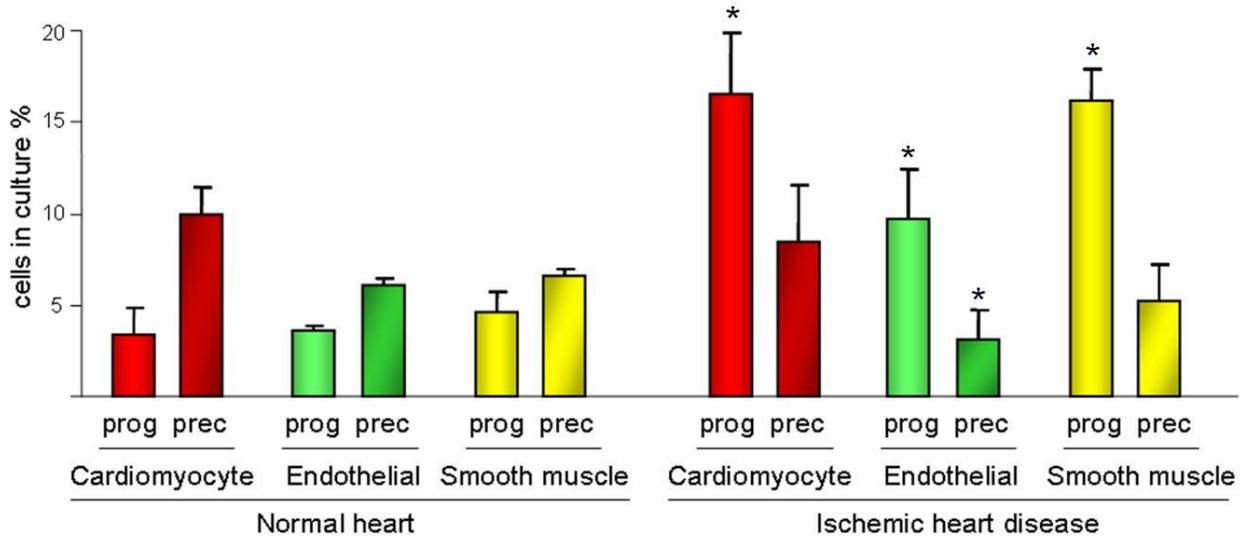


**Figura 3.** Heatmaps derivate dall'analisi, mediante il “*Gene Functional Classification Tool*” del DAVID, dei dati di espressione genica derivati dal PIQOR *Sem Cell Microarray*. Rappresentazione dei geni up-regolati nelle cellule primitive cardiache CD117(+) isolate dai cuori post-ischemici.



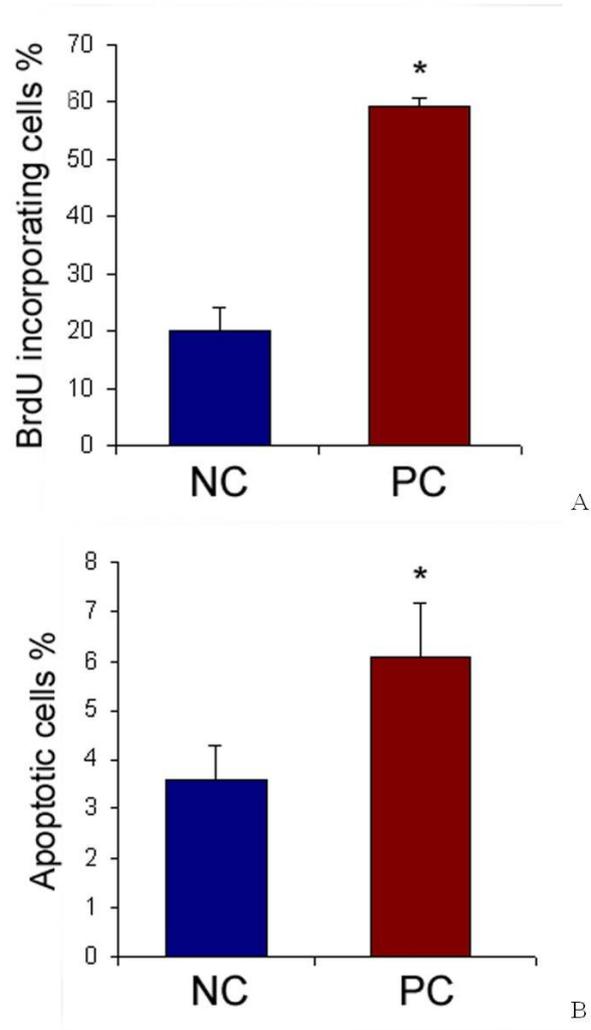
**Figura 4.** Immagine di immunofluorescenza in cui sono riportati i progenitori (positivi per specifici fattori di trascrizione) ed i precursori (positivi per specifiche proteine strutturali) dei cardiomiociti (A), delle cellule muscolari lisce dei vasi (B) e delle cellule endoteliali (C-D), ottenuti *in vitro* dalle cellule primitive cardiache CD117(+).

\*progenitori esprimenti i fattori di trascrizione, specifici per ciascuna linea cellulare.



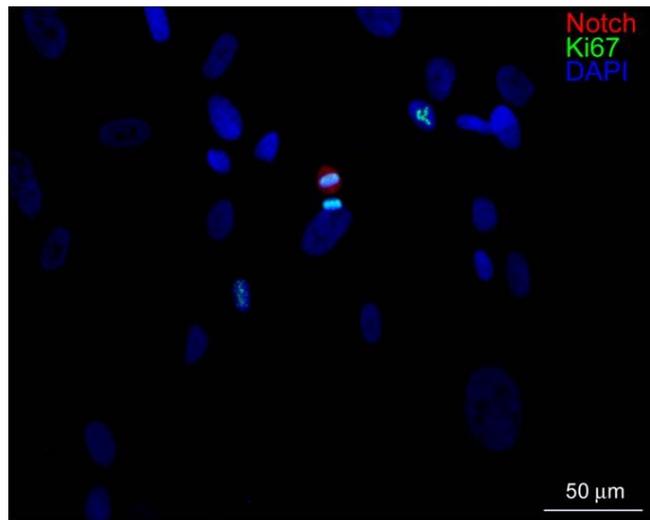
**Figura 5.** Distribuzione del numero di progenitori e precursori derivati dalle cellule CD117(+) solate dai cuori umani adulti normali e post-ischemici. Le barre corrispondono alla media $\pm$ DS delle cellule primitive cardiache positive per ciascun marcatore tipico di un progenitore o di un precursore.

\*p<0,05.

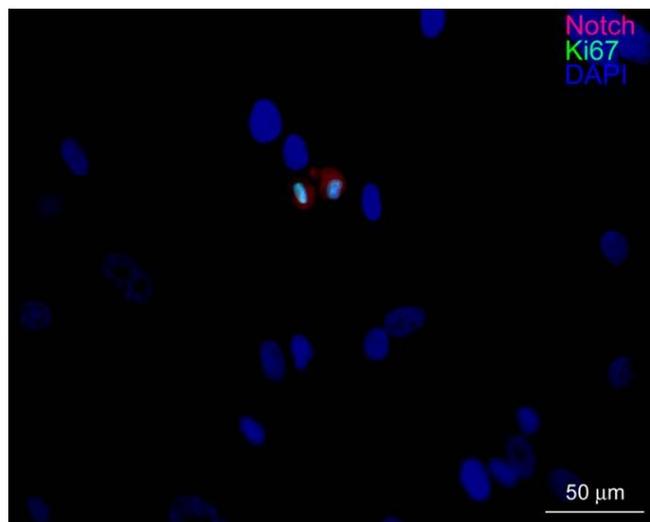


**Figura 6.** Proliferazione e apoptosi delle cellule primitive cardiache CD117(+) isolate da cuori umani adulti normali (NC) e espantati per insufficienza cardiaca post-ischemica (PC). Le barre corrispondono alla media $\pm$ DS della percentuale di cellule positive per BrdU (A) o della percentuale di cellule apoptotiche (B).

\*p<0,05.



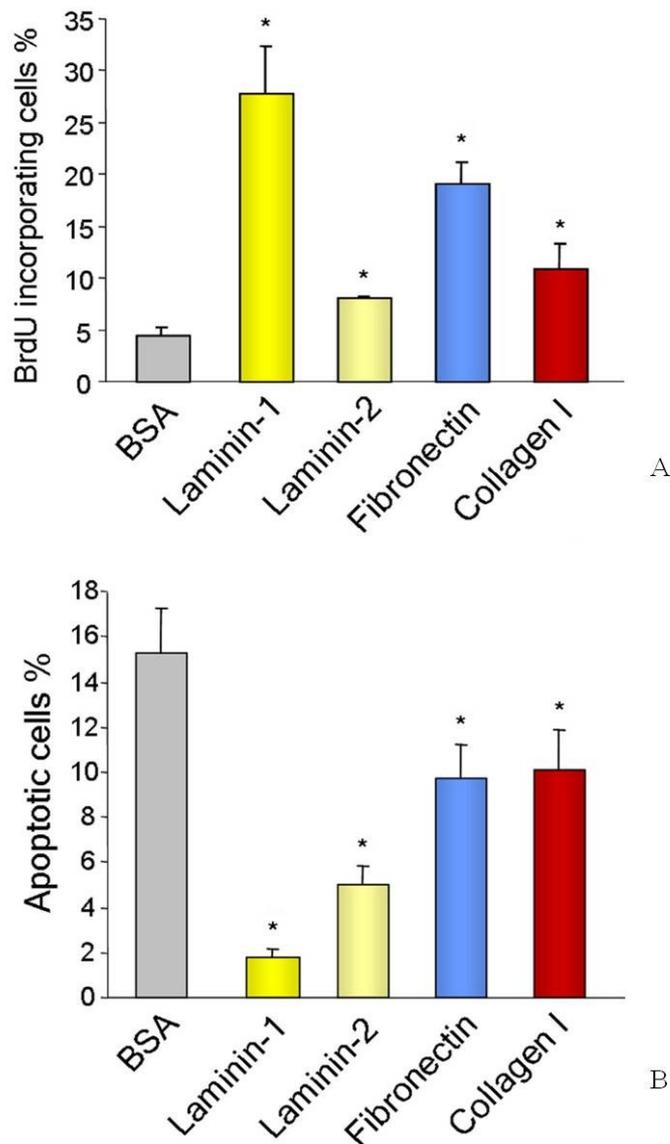
A



B

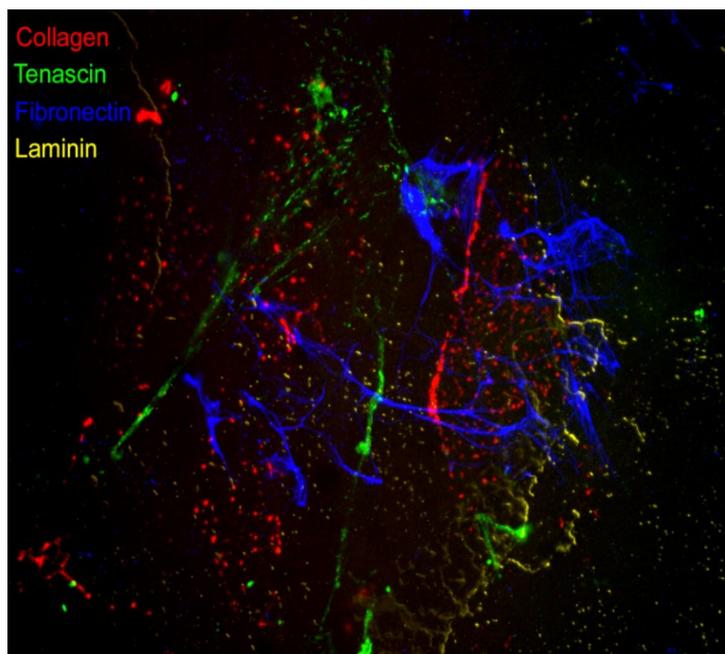
**Figura 7.** Valutazione, mediante immunofluorescenza, della distribuzione di Notch in cellule CD117(+), normali e patologiche, in divisione mitotica (positive per Ki67).

(A) cellule figlie con equa distribuzione di Notch: divisione simmetrica. (B) cellule figlie con differente distribuzione di Notch: divisione asimmetrica.

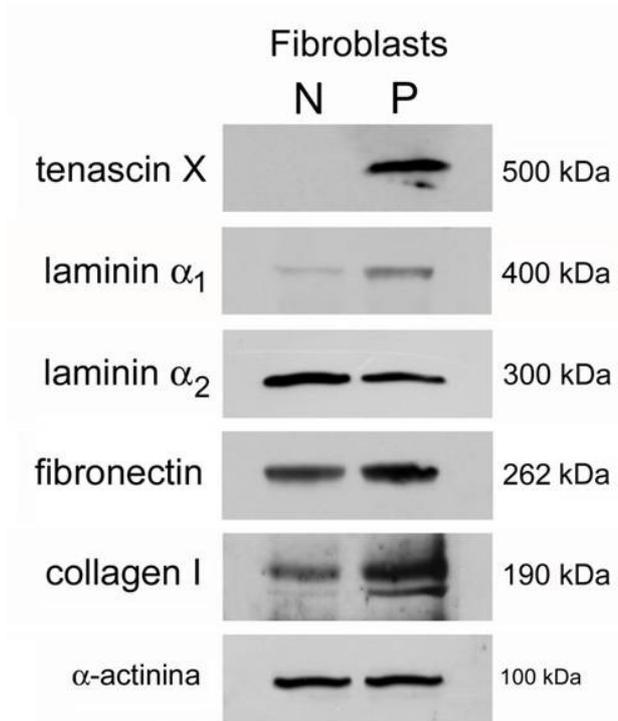


**Figura 8.** Valutazione della proliferazione e dell'apoptosi delle cellule CD117(+), normali e patologiche, in coltura su piastre rivestite, rispettivamente, con albumina, laminina-1, laminina-2, fibronectina e collagene I. L'albumina di siero bovino (BSA) è stata utilizzata come controllo. Le barre corrispondono alla media $\pm$ DS della percentuale di cellule positive per BrdU (A), o della percentuale di cellule apoptotiche (B).

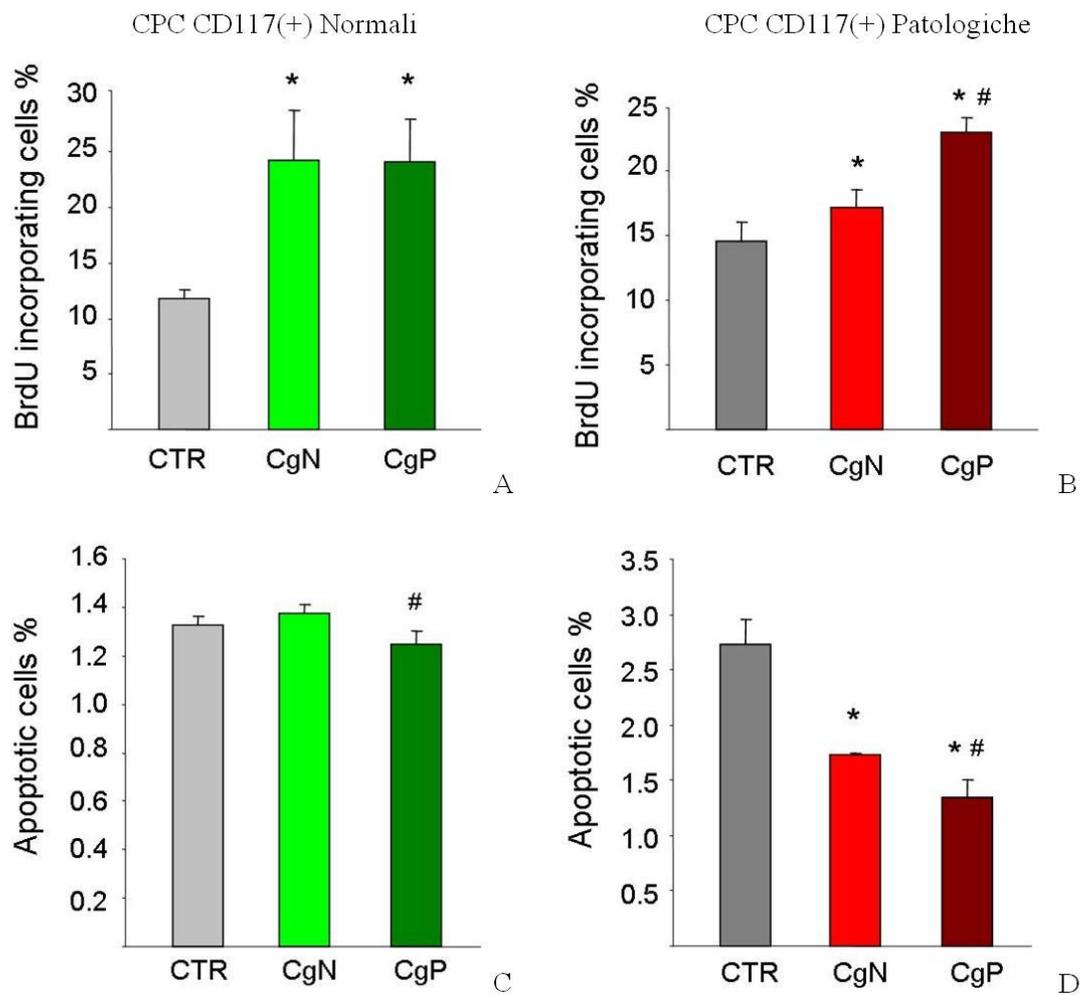
\* $p < 0,05$ .



**Figura 9.** Valutazione qualitativa della composizione proteica del *cardiogel* mediante immunofluorescenza.



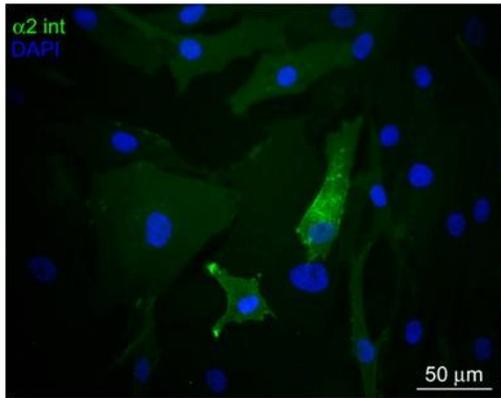
**Figura 10.** Valutazione semi-quantitativa della composizione proteica del *cardiogel*, mediante *immunoblotting*.



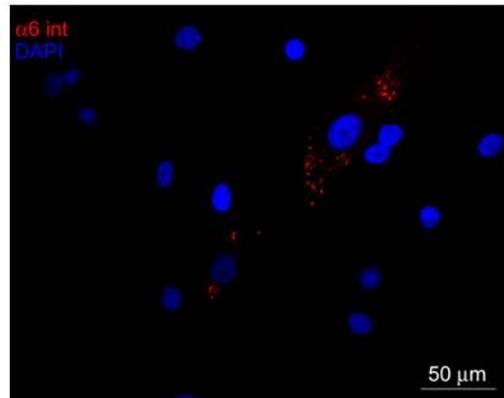
**Figura 11.** Proliferazione e apoptosi delle cellule primitive cardiache CD117(+) isolate dai cuori umani adulti normali e da cuori agli stadi terminali dell'insufficienza cardiaca, in coltura sul *cardiogel* normale (CgN), sul *cardiogel* patologico (CgP), e su piastre prive di rivestimento proteico (CTR), utilizzate come controllo. Le barre corrispondono alla media $\pm$ DS della percentuale di cellule positive per BrdU (A-B) o della percentuale di cellule apoptotiche (C-D).

\* $p < 0,05$  CgN vs CgP;

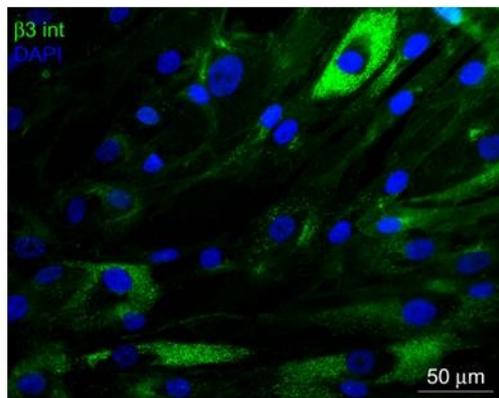
# $p < 0,05$  CgP vs CgN.



A

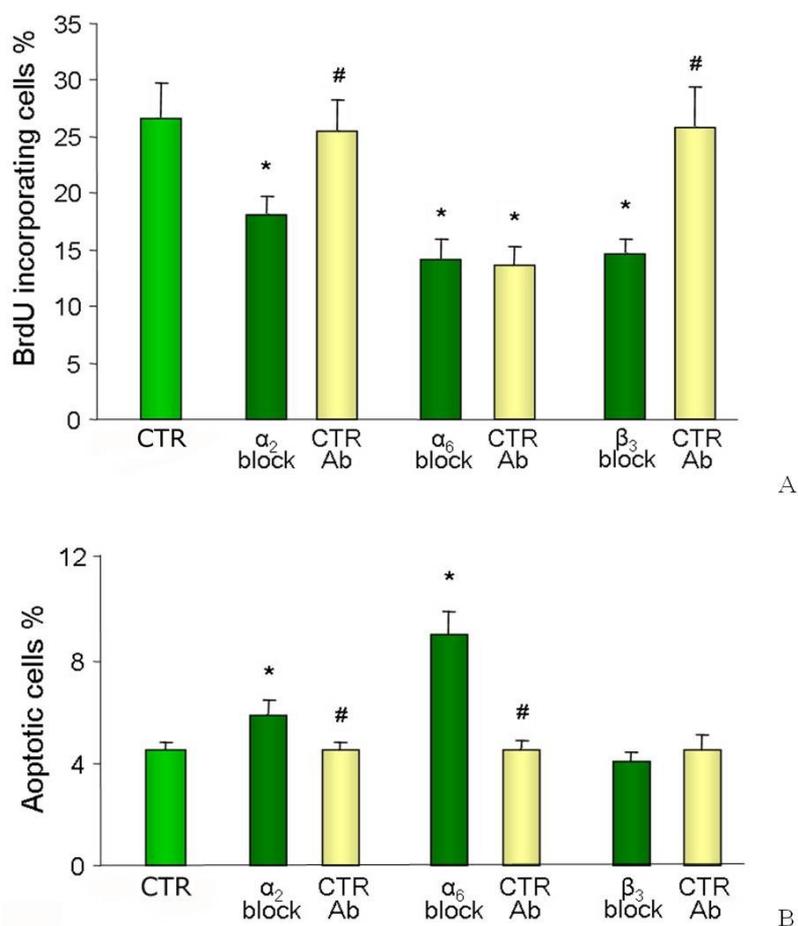


B



C

**Figura 12.** Valutazione mediante immunofluorescenza dell'espressione delle catene integriniche  $\alpha$  e  $\beta$  sulle cellule CD117(+) in coltura sul *cardiogel* normale (C) e patologico (A-B).



**Figura 13.** Valutazione degli effetti del blocco delle catene integriniche sulla proliferazione e sull'apoptosi delle cellule primitive cardiache CD117(+) isolate dai cuori umani adulti normali.

Tre gruppi di cellule CD117(+) in coltura sul *cardiogel* patologico (CgP) sono stati incubati, rispettivamente, con anticorpi bloccanti specifici per l'integrina  $\alpha_2$  ( $\alpha_2$ -block), con anticorpi bloccanti specifici per l'integrina  $\alpha_6$ , con anticorpi aspecifici dello stesso isotipo dell'anticorpo anti-integrina  $\alpha_2$  e dell'anticorpo anti-integrina  $\alpha_6$  (CTR-Ab), e in assenza di anticorpo (CTR).

Tre gruppi di cellule CD117(+) in coltura sul *cardiogel* normale (CgN) sono stati incubati, rispettivamente, con anticorpi bloccanti specifici per l'integrina  $\beta_3$  ( $\beta_3$ -block), con anticorpi aspecifici dello stesso isotipo dell'anticorpo anti-integrina  $\beta_3$  (CTR-Ab), e in assenza di anticorpo (CTR). Le barre corrispondono alla media $\pm$ DS della percentuale di cellule positive per BrdU (A) o della percentuale di cellule apoptotiche (B).

\* $p < 0,05$  vs CTR; # $p < 0,05$  CTR Ab vs i rispettivi anticorpi bloccanti.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami AC, and Anversa P *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. The New England Journal of Medicine. 344: 1750-1757; 2001.
2. Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, and Anversa P. *Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy*. Proceedings of National USA Academy of Science, 100(18):10440-10445; 2003.
3. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, and Anversa P. *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 114: 763-776; 2003.
4. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. *Human cardiac stem cells*. Proceedings of National USA Academy of Science, 104(35):14068-73; 2007.
5. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, and Anversa P. *Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure*. Proceedings of National USA Academy of Science, 102: 8692-8697; 2005.
6. Fransioli J, Bailey B, Gude NA, Cottage CT, Muraski JA, Emmanuel G, Wu W, Alvarez R, Rubio M, Ottolenghi S, Schaefer E, Sussman MA. *Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium*. Stem Cell, 26(5):1315-24; 2008.
7. Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C and Rappaport L. *The extracellular matrix and cytoskeleton in heart hypertrophy and failure*. Heart Failure Review, 5: 239-250; 2000.
8. Bosman F and Stamenkovic I. *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. Journal of Pathology, 200: 423-428; 2003.
9. Lodish H, Berek A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Biologia Molecolare della cellula*. Zanichelli 2<sup>a</sup> ed., 2002.
10. Iruela-Arispe ML & Sage EH. *Expression of type VIII collagen during morphogenesis of the chicken and mouse heart*. Developmental Biology, 144:107-118; 1991.

11. Robinson TF, Geraci MA, Sonnenblick EH, Factor SM. *Coiled perimysial fibers of papillary muscle in rat heart: morphology, distribution, and changes in configuration*. Circulation Research, 63:577-592; 1988.
12. Wierzbicka-Patynowski I and Schwarzbauer JE. *The ins and outs of fibronectin matrix assembly*. Journal of Cell Science, 116: 3269-3276; 2003.
13. Colognato H and Yurchenco PD. *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. Developmental Dynamics Biology; 218: 213-234; 2000.
14. Miner JH, Yurchenco PD. *Laminin functions in tissue morphogenesis*. Annual Review of Cell and Developmental Biology; 20:255–284; 2004.
15. Ross RS, Borg TK. *Integrins and the myocardium*. Circulation Research, 88(11):1112-1119; 2001.
16. Giancotti FG, Tarone G. *Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling*. Annual Review of Cell and Developmental Biology; 19:173-206; 2003.
17. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. *Cardiac remodelling-concept and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodelling*. Journal of the American College of Cardiology; 35:569-582; 2000.
18. Frangogiannis NG. *The immune system and cardiac repair*. Pharmacological Research; 58(2):88-111; 2008.
19. Adair-Kirk TL, Senior RM. *Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 40:1101-10; 2008.
20. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M, et al. *Matrix metalloproteinases and processing of pro-TGF- $\alpha$* . Journal of Leukocyte Biology; 57:774-7; 1995.
21. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure* The Annual Review of Pharmacology and Toxicology; 45:657-87; 2005.
22. Camelliti P, Borg TK, Kohl P. *Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts* Cardiovascular Research; 65(1):40-51; 2005.

23. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. *The myofibroblast. One function, multiple origins*. The American Journal of Pathology; 170(6):1807-1816; 2007.
24. Mydel P, Shipley JM, Adair-Kirk TL, Kelley DG, Broekelmann TJ, Mecham RP, Senior RM. *Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils*. The Journal of Biological Chemistry; 283(15):9513-9522; 2008.
25. Trial J, Rossen RD, Rubio J, Knowlton AA. *Inflammation and ischemia: macrophages activated by fibronectin fragments enhance the survival of injured cardiac myocytes*. Experimental Biology and Medicine; 229(6):538-545; 2004.
26. Schedin P, Strange R, Mitrenga T, Wolfe P, Kaeck M. *Fibronectin fragments induce MMP activity in mouse mammary epithelial cells: evidence for a role in mammary tissue remodeling*. Journal of Cell Science; 113(5):795-806; 2000.
27. Schellings MWM, Pinto YM, Heymans S. *Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodelling*. Cardiovascular Research, 64: 24-31; 2004.
28. Fujimoto N, Onishi K, Sato A, Terasaki F, Tsukada B, Nozato T, Yamada T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Ito M, Hiroe M. *Incremental prognostic values of serum tenascin-C levels with blood B-type natriuretic peptide testing at discharge in patients with dilated cardiomyopathy and decompensated heart failure*. Journal of Cardiac Failure; 15(10):898-905; 2009.
29. Beower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS. *The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function*. European Journal of Cardiothoracic Surgery; 30(4):604-10; 2006.
30. Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J. *Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction*. The Journal of Clinical Investigation; 106(7):857-66; 2000.
31. Tao ZY, Cavaasin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. *Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice*. Life Science; 74(12):1561-72; 2004.
32. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. *Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats*. Circulation Research; 67(1):23-34; 1990.

33. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. *Nature*; 410(6829):701-5; 2001.
34. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. *Proceedings of National USA Academy of Science*; 98(18):10344-9; 2001.
35. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. *The Journal of Clinical Investigation*; 107(11):1395-402; 2001.
36. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. *Nature*; 428(6983):668-73; 2004.
37. Schaefer A, Zwadlo C, Fuchs M, Meyer GP, Lippolt P, Wollert KC, Drexler H. *Long-term effects of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: 5-year results from the randomized-controlled BOOST trial--an echocardiographic study*. *The European Journal of Echocardiography*; 11(2):165-71; 2010.
38. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE. *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. *Nature Biotechnology*; (9):1015-24; 2007.
39. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. *Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear*. *Plastic and Reconstructive Surgery*; 100(2):297-302; 1997.
40. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. *Tissue-engineered bone regeneration*. *Nature Biotechnology*; 18(9):959-63; 2000.

41. Banta MN, Kirsner RS. *Modulating diseased skin with tissue engineering: actinic purpura treated with Apligraf*. *Dermatologic Surgery*; 28(12):1103-6; 2002.
42. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. *Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium*. *The New England Journal of Medicine*; 351(12):1187-96; 2004.
43. Nathaniel S, Hwang, Varghese S, Elisseeff J. *Controlled differentiation of stem cells*. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 60(2):199-214; 2008.
44. Wei HJ, Chen SC, Chang Y, Hwang SM, Lin WW, Lai PH, Chiang HK, Hsu LF, Yang HH, Sung HW. *Porous acellular bovine pericardium seeded with mesenchymal stem cells as a patch to repair a myocardial defect in a syngeneic rat model*. *Biomaterials*; 27(31):5409-19; 2006.
45. Tan MY, Zhi W, Wei RQ, Huang YC, Zhou KP, Tan B, Deng L, Luo JC, Li XQ, Xie HQ, Yang ZM. *Repair of infarcted myocardium using mesenchymal stem cell seeded small intestinal submucosa in rabbits*. *Biomaterials*; 30(19):3234-40; 2009.
46. Martens TP, Godier AF, Parks JJ, Wan LQ, Koeckert MS, Eng GM, Hudson BI, Sherman W, Vunjak-Novakovic G. *Percutaneous cell delivery into the heart using hydrogels polymerizing in situ*. *Cell Transplantation*; 18(3):297-304; 2009.
47. Freshney RI. *Culture of animal cells*. 4<sup>a</sup> ed.: 149-177, New York: Wiley-Liss; 2000.
48. Vanwinkle WB, Snuggs MB and Buja LM. *Cardiogel: a biosynthetic extracellular matrix for cardiomyocyte culture*. *In Vitro Cell*, 32: 478-485; 1996.
49. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK. *The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 38: 495-503; 2005.
50. Di Meglio F, Castaldo C, Nurzynska D, Romano V, Miraglia R, Bancone C, Langella G, Vosa C, Montagnani S. *Epithelial–mesenchymal transition of epicardial mesothelium is a source of cardiac CD117-positive stem cells in adult human heart*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 49:719-727; 2010.
51. Kawahashi K, Hayashi S. *Dynamic intracellular distribution of Notch during activation and asymmetric cell division revealed by functional fluorescent fusion proteins*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*; 15(7):749-59; 2010.

52. Nelson CM, Bissell MJ. *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annual review of cell and developmental biology; 22:287-309; 2006.
53. De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefebvre O, Kedinger M, Simon-Assmann P. *Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation*. Journal of Cell Biology; 133:417-430; 1996.
54. Yurchenco PD, Cheng YS, Campbell K, Li S. *Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-2 deficient muscular dystrophy*. Journal of Cell Science; 117:735-742; 2004.
55. Wagers AJ, Weissman IL. *Differential expression of  $\alpha_2$  integrin separates long-term and short-term reconstituting  $Lin^{-lo}$   $Thy1.1^{lo}$   $c-kit^+$   $Sca-1^+$  hematopoietic stem cells*. Stem Cells; 24:1087-1094; 2006.
56. Maitra N, Flink IL, Morkin E. *Expression of alpha and beta integrins during terminal differentiation of cardiomyocytes*. Cardiovascular Research; 47: 715-725; 2000.
57. Mercurio AM, Rabinovitz I and Shaw LM. *The  $\alpha_6\beta_4$  integrin and epithelial cell migration*. Current Opinion in Cell Biology; 13(5):541-545; 2001.
58. Vacca A, Ria R, Presta M, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Tanghetti E, Dammacco F. *Alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells*. Experimental hematology; 29(8):993-1003; 2001.
59. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis N. *The extracellular matrix as a modulator of inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology; 2009.
60. Yao EH, Yu Y, Fukuda N. *Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases*. Curr Pharm Biotechnol; 7:101-108; 2006.

## ***RINGRAZIAMENTI***

Giunta a conclusione di questo lavoro desidero ringraziare tutti coloro che hanno collaborato con me.

In particolare, ringrazio la Prof.ssa Stefania Montagnani per la sua grande disponibilità e per avermi dato l'opportunità di approfondire i miei studi durante questo dottorato di ricerca.

I miei più sentiti ringraziamenti vanno alla Dott.ssa Franca Di Meglio, alla Dott.ssa Tilly Castaldo e alla Dott.ssa Daria Nurzynska che mi hanno costantemente seguito, aiutandomi a credere in me stessa e trasmettendomi l'entusiasmo per la ricerca.

Infine, ringrazio di cuore la Dott.ssa Romano Veronica per avermi supportato e sopportato da collega di studio e non solo.