

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E FUNZIONALI

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

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani



Tesi di dottorato di ricerca

**LE CELLULE STAMINALI CARDIACHE ORIGINANO DALLA  
TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE DELLE CELLULE  
DELL'EPICARDIO NEL CUORE UMANO ADULTO**

Relatore:

Prof.ssa Stefania Montagnani

Candidata:

Dott. Veronica Romano

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

# INDICE

Sommario.....	3
1.INTRODUZIONE.....	5
1.1. LA TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE (EMT).....	5
1.1.1 L’EMT NELL’EMBRIONE.....	6
1.1.2. L’EMT NELL’ADULTO.....	8
1.2. CELLULE STAMINALI CARDIACHE.....	10
2. SCOPO.....	12
3. MATERIALI E METODI.....	13
3.1. MATERIALI.....	13
3.2. IMMUNOISTOCHIMICA.....	13
3.2.1. BLU DI TOLUIDINA.....	14
3.3. COLTURE CELLULARI.....	14
3.3.1. FORMAZIONE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE IN VITRO.....	14
3.3.2. ISOLAMENTO DELLE CELLULE CD117 POSITIVE.....	15
3.3.3.COLTURA DELLE CELLULE DELL’EPICARDIO IN VITRO.....	15
3.4. IMMUNOCITOCHIMICA.....	15
3.5. RT PCR.....	16
3.6. ANALISI STATISTICA.....	17
4. RISULTATI.....	18
4.1. DIVERSA LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE DELL’EPICARDIO E DEL SUBEPICARDIO NEI CUORI NORMALI E PATOLOGICI.....	18
4.2. LE CELLULE EPICARDICHE DEL CUORE UMANO ADULTO VANNO INCONTRO A TRANSIZIONE IN VITRO ED ESPRIMONO CD117.....	19
5. DISCUSSIONE.....	20
6. ICONOGRAFIA.....	24
7. BIBLIOGRAFIA.....	34
RINGRAZIAMENTI.....	37

## Sommario

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è coinvolta nel rimodellamento tissutale durante lo sviluppo embrionale e in diversi processi fisiopatologici nella vita adulta, quali ad esempio l'invasione e la diffusione delle metastasi tumorali.

Durante lo sviluppo cardiaco alcune cellule dell'epicardio vanno incontro ad EMT dando origine ad una nuova popolazione di cellule, note come *EPicardially Derived Cells* (EPDC), che migrando nel miocardio, contribuiscono alla formazione dei cardiomiociti e dei fibroblasti cardiaci, e, inoltre, partecipano allo sviluppo delle fibre del Purkinje, dello scheletro fibroso e della vascolarizzazione del cuore.

Studi recenti hanno dimostrato che nel cuore umano adulto le EPDC, derivate dall'EMT delle cellule epicardiche, conservano caratteristiche simili a quelle embrionali.

La presenza di numerose cellule staminali cardiache, CD117 positive, nel subepicardio di cuori umani adulti, ha portato ad ipotizzare che le EPDC possano essere coinvolte nell'origine di tale popolazione cellulare.

Allo scopo di valutare questa ipotesi e stabilire un possibile legame tra l'epicardio, le EPDC e le cellule staminali cardiache, sono state analizzate, *in vivo* e *in vitro*, cellule dell'epicardio derivate da cuori umani adulti normali e con cardiomiopatia post-ischemica.

Dall'analisi *in vivo* è emerso che nel cuore post-ischemico, le cellule dell'epicardio migrano dalla superficie cardiaca verso il sub-epicardio, dove sono presenti cellule positive per marcatori mesoteliali e mesenchimali, mentre, nel cuore normale, tali cellule sono localizzate esclusivamente nell'epicardio. L'analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR ha rivelato, inoltre, che nel cuore normale adulto vi è una maggiore espressione dei geni epiteliali, rispetto al cuore patologico, dove è evidente un aumento dell'espressione dei geni codificanti per antigeni mesenchimali.

Al fine di valutare l'EMT *in vitro*, frammenti di epicardio isolati da cuori umani adulti normali sono stati messi in coltura su uno specifico substrato formato dalla matrice extracellulare prodotta dai fibroblasti cardiaci. In tali condizioni è stata osservata la crescita di cellule con fenotipo ed espressione genica tipici delle cellule epiteliali.

Inducendo l'EMT *in vitro*, mediante l'aggiunta di TGF $\beta$ , è stato confermato che l'espressione della E-caderina e della Citocheratina 5/6, marcatori epiteliali, è ridotta nelle EPDC rispetto alle cellule epiteliali dell'epicardio, mentre risulta aumentata l'espressione dei geni codificanti per i marcatori mesenchimali, quali la vimentina e la M-caderina. Inoltre gran parte delle EPDC esprime il recettore di superficie CD117, marcatore delle cellule staminali cardiache.

Questi studi supportano quindi l'ipotesi che nel cuore umano adulto la transizione epitelio-mesenchimale possa essere attivata, *in vivo* ed *in vitro*, generando una popolazione di cellule CD117 positive con caratteristiche tipiche delle cellule mesenchimali.

L'attivazione dell'EMT nel cuore umano adulto potrebbe avere un ruolo fondamentale nel *turnover* cellulare cardiaco che permette di rigenerare e conservare il *pool* di cellule staminali cardiache indispensabili nel processo di riparazione in seguito a danno tissutale.

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1. LA TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE (EMT)

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un importante meccanismo embrionale utilizzato per il rimodellamento tissutale e può essere definito come un processo durante il quale le cellule epiteliali perdono gran parte delle loro caratteristiche per acquisire proprietà tipiche delle cellule mesenchimali.

Le cellule epiteliali formano generalmente un unico strato continuo in cui sono fittamente stipate e strettamente unite mediante complessi giunzionali, tra cui desmosomi, giunzioni occludenti (*tight junctions*) e giunzioni serrate (*gap junctions*). Sono cellule polarizzate, in cui cioè è possibile individuare un polo basale, un polo apicale e dei poli laterali che differiscono tra loro nella distribuzione di marcatori di membrana e molecole di adesione, nella disposizione delle giunzioni intercellulari e degli organuli, nell'organizzazione del citoscheletro e nella funzione. Il polo basale è a contatto con la membrana basale, uno strato continuo di matrice extracellulare (ECM) specializzata a cui le cellule sono ancorate. Le molecole per l'adesione cellula-cellula coinvolgono membri della famiglia delle caderine, come la E-caderina, e hanno una localizzazione preferenziale sulle superfici laterali delle cellule, mentre le principali molecole per l'adesione con l'ECM si trovano al polo basale e appartengono alla famiglia delle integrine. Le cellule epiteliali possiedono inoltre filamenti intermedi di citocheratina, sono in grado di proliferare, ma non migrano al di fuori dell'epitelio e in coltura crescono in gruppi restando in contatto tra loro attraverso le giunzioni intercellulari.

Le cellule mesenchimali, invece, non formano strati organizzati, i contatti tra loro sono tipicamente ed esclusivamente focali e si stabiliscono attraverso numerose espansioni citoplasmatiche mediante la N-caderina. Molteplici sono invece i contatti con la matrice extracellulare, mediati dalle integrine. Le cellule mesenchimali non poggiano sulla membrana basale ma sono immerse in una matrice acellulare complessa e non presentano una polarizzazione nella distribuzione dei marcatori di membrana né del citoscheletro, inoltre possiedono filamenti intermedi di vimentina e hanno una forma irregolare, fusata o stellata; sono dotate di movimenti ameboidi e hanno la capacità di migrare. In coltura assumono una forma fibroblastoide e presentano le *stress fibers*.

L'EMT è un processo molto complesso a livello molecolare e coinvolge eventi biologici diversi. In un epitelio in transizione infatti scompare la polarizzazione, le giunzioni si disaggregano e i filamenti intermedi di citocheratina vengono sostituiti da *stress fibers* di F-actina. In seguito alla

dissociazione delle giunzioni specializzate le cellule perdono i contatti intercellulari e assumono una forma allungata, riorganizzano il citoscheletro, acquisiscono nuovi recettori per la matrice extracellulare ed esprimono le metalloproteasi, che permettono alle cellule di attraversare la membrana basale, invadere la matrice sottostante e migrare (figura 1).

Variazioni a livello molecolare osservate nell'EMT includono l'aumento dell'espressione di N-caderina e vimentina, la riduzione dell'espressione di E-caderina e citocheratina, la localizzazione nucleare della  $\beta$ -catenina, l'aumento della produzione dei fattori di trascrizione che inibiscono la produzione di E-caderina come Snail, Slug e Twist (1,2).

L'EMT è indotta da segnali extracellulari, come componenti della matrice extracellulare, collagene e acido ialuronico, ma anche da fattori di crescita solubili come membri della famiglia del TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor*), dell'FGF (*Fibroblast Growth Factor*) o dell'EGF (*Epidermal Growth Factor*). Si tratta di fattori che legano recettori di membrana dotati di un dominio intracellulare con attività tirosin chinasi: dopo il legame con il ligando questo dominio del recettore viene fosforilato e recluta e attiva molecole effettrici intracellulari, come Ras, Rho, Rac e Src. Queste molecole, in particolare Ras, attivano il fattore trascrizionale Snail che inibisce l'espressione della E-caderina legando il promotore del gene e bloccandone l'espressione.

L'attivazione di Snail risulta quindi nella perdita dei marcatori epiteliali e nell'acquisizione di marcatori e di proprietà tipiche delle cellule mesenchimali come la morfologia di tipo fibroblastico, l'invasività e la capacità a migrare. Anche Wnt ha un ruolo importante nell'induzione dell'EMT: il suo legame al recettore inibisce l'attivazione di GSK3 $\beta$  con conseguente aumento dei livelli citoplasmatici di  $\beta$ -catenina. Quest'ultima migra nel nucleo e attiva la trascrizione di LEF-1, ciò porta ad una ridotta espressione di E-caderina e alla transizione delle cellule epiteliali verso il fenotipo mesenchimale (3) (figura 2).

### *1.1.1 L'EMT NELL'EMBRIONE*

La prima e più importante EMT negli embrioni dei vertebrati produce il mesenchima che formerà il mesoderma definitivo e l'endoderma, durante il processo della gastrulazione.

I primi studi sull'EMT nel cuore sono stati condotti in embrioni aviari, in cui la transizione epitelio-mesenchimale dell'endocardio porta allo sviluppo delle valvole atrioventricolari ed è influenzata da fattori di crescita quali il TGF $\beta$ 2 e il TGF $\beta$ 3 e da BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2) e BMP4 che sembrano stimolare il processo.

Nell'epicardio l'EMT è responsabile invece della formazione di uno strato di cellule mesenchimali che derivano dalle cellule epiteliali dell'epicardio primitivo e migrano nel subepicardio. Tali cellule

sono note come EPDC (EPicardially-Derived Cells). Dopo l'EMT, le EPDC sono cellule indifferenziate ed esprimono infatti marcatori tipici delle cellule indifferenziate quali slug e WT1. L'EMT nell'epicardio è stimolata da fattori di crescita quali l'FGF, il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e l'EGF, mentre è inibito dal TGF $\beta$ .

Sia nell'EMT endocardica che in quella epicardica sono coinvolti i fattori trascrizionali ets1 e slug. Slug stimola l'EMT sopprimendo l'espressione di molecole di adesione, come la E-caderina, dalle cellule epiteliali. Ets1 è un fattore trascrizionale che attiva l'espressione di enzimi proteolitici che degradano la matrice extracellulare permettendo così la migrazione delle cellule.

Alcune EPDC restano però nel subepicardio, non differenziano ed esprimono RALDH2 (recettore per l'acido arachidonico) e WT1, che vengono invece perduti dalle cellule che differenziano (4).

Sono stati condotti molteplici studi allo scopo di definire il ruolo delle EPDC nello sviluppo embrionale ed è stato dimostrato che con l'aggiunta di fattori specifici le EPDC danno origine a cardiomiociti se stimolate con BMP2, differenziano in cellule endoteliali in presenza di VEGF, in cellule muscolari lisce e fibroblasti se stimolate con PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (figura 3).

Nei mammiferi un ruolo chiave nell'EMT nella vita intrauterina è svolto dal recettore per l'FGF (FGFR1) che in seguito ad attivazione stimola Snail inibendo l'espressione di E-caderina (5).

Nell'Uomo l'EMT è responsabile della formazione delle strutture del circolo coronarico, delle valvole atrioventricolari e delle componenti non muscolari del miocardio. Infatti durante il *looping stage* il miocardio secreta fattori che stimolano l'EMT sia nell'endocardio che nell'epicardio. Nella transizione endocardica il primo fattore coinvolto è Notch che viene secreto dal miocardio e attiva TGF $\beta$  che stimola a sua volta l'attivazione di fattori trascrizionali come smad-2, 3 e 4. Questi stimolano Snail che inibisce la trascrizione di E-caderina. Tale fenomeno porta alla formazione dei cuscinetti endocardici e delle valvole atrioventricolari (6).

Prima della formazione dei cuscinetti endocardici e successivamente, durante la vita post-natale, l'EMT nell'endocardio è inibita dal VEGF secreto dal miocardio.

Analogamente, una subpopolazione delle cellule del mesotelio epicardico va incontro ad EMT, dando origine a cardiomiociti, a fibroblasti cardiaci e a componenti del sistema coronarico, come le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce.

E' stato dimostrato che durante lo sviluppo l'FGF prodotto dalle cellule del miocardio stimola l'espressione e l'incorporazione di vimentina nel citoscheletro delle cellule mesoteliali dell'epicardio. Queste cellule secernendo FGF-2 sono sottoposte ad attivazione autocrina: esse si separano dall'epicardio, passano attraverso la membrana basale, invadono la matrice subepicardica

e le trabecole del miocardio embrionale e diventano cellule mesenchimali; grazie alla presenza dei recettori per il VEGF ed il PDGF formano quindi i vasi sanguigni primitivi, differenziandosi nelle successive fasi dello sviluppo in cellule muscolari lisce (in seguito all'azione di TGF $\beta$ ) e nell'endotelio. Nella vita post-natale l'EMT è inibita nell'epicardio dalla presenza di VCAM-1 e di integrina  $\beta$ 4, entrambi indispensabili per il mantenimento dell'epicardio adulto (7,5).

### 1.1.2. L'EMT NELL'ADULTO

Molti studi sono stati condotti sull'EMT nell'adulto ed è stato dimostrato il suo coinvolgimento nella patogenesi di diverse malattie.

La malattia cronica del rene è caratterizzata da una progressiva fibrosi che porta a perdita di funzione renale. La fibrosi è associata ad un aumento dei miofibroblasti che depositano matrice extracellulare (8,9). I processi infiammatori indotti dal danno cellulare causano un aumento di fattori come TGF $\beta$ , EGF e FGF che possono indurre EMT delle cellule dell'epitelio tubulare, e numerose evidenze sperimentali dimostrano che i fibroblasti interstiziali derivano dall'epitelio dei tubuli renali (10,11).

Nell'insufficienza renale la dialisi peritoneale causa un danno al mesotelio della sierosa peritoneale, che induce espressione di Snail, EMT delle cellule mesoteliali e fibrosi, probabilmente come risultato di una produzione eccessiva di TGF $\beta$  (12,13).

La produzione di TGF $\beta$  è aumentata anche nei polmoni di pazienti con malattia polmonare fibrotica: in questo caso il TGF $\beta$  induce EMT delle cellule epiteliali alveolari (14, 15).

Numerosi studi hanno ormai dimostrato che l'EMT ha un ruolo centrale anche nella progressione dei tumori. Quando le cellule di un carcinoma diventano capaci di metastatizzare le loro proprietà adesive cambiano e vengono attivate la proteolisi e la motilità cellulare che consentono alle cellule tumorali di migrare in sedi diverse dalla massa tumorale e formare un tumore secondario distante dal primario. Inoltre c'è una buona correlazione tra espressione di un repressore trascrizionale della E-caderina, come Snail, ed invasività delle cellule tumorali. Del resto l'induzione di EMT in molte linee cellulari di carcinoma determina l'acquisizione di proprietà metastatiche *in vivo*. La dimostrazione più evidente del coinvolgimento dell'EMT nella progressione dei tumori è la capacità da parte di molteplici regolatori dell'EMT di aumentare la formazione di tumori e/o metastasi: l'espressione di Snail aumenta l'aggressività di tumori della mammella indotti sperimentalmente e un'alta espressione di Snail è correlata ad un aumentato rischio di recidive e ad una minore sopravvivenza nel cancro della mammella nell'Uomo (16).

Snail è espresso specificamente anche nel cancro invasivo del colon, nelle cellule che hanno oltrepassato la membrana basale, hanno perso l'espressione di E-caderina e presentano positività nucleare per  $\beta$ -catenina. La perdita di E-caderina è infatti segno caratteristico di carcinoma metastatico (17).

L'EMT sembra avere un ruolo importante anche nel turnover cellulare dell'intestino nell'adulto: studi recenti hanno dimostrato che cellule mesoteliali della sierosa intestinale, che esprimono la proteina WT1, vanno incontro ad EMT. Le cellule mesenchimali così formate, se opportunamente stimolate, danno origine a cellule muscolari lisce dei vasi e ad altre linee cellulari dell'intestino (18).

Quindi, anche nell'adulto le cellule della sierosa conservano le capacità rigenerative tipiche delle cellule embrionali e possono rappresentare una riserva di cellule in grado di riparare danni tissutali. L'EMT nell'intestino è infatti un processo tipico anche dell'embriogenesi ed è responsabile dello sviluppo di cellule muscolari lisce che andranno a formare i vasi sanguigni dell'intestino (19).

Le somiglianze nella struttura e nello sviluppo tra l'intestino e il cuore e l'importanza dell'EMT nello sviluppo di quest'ultimo, hanno stimolato numerosi studi volti a stabilire se questo fenomeno sia ancora attivo nel cuore umano adulto e quale sia, eventualmente, il suo ruolo.

I primi studi sull'EMT epicardica e sulle EPDC derivano da modelli murini e di pollo.

Solo di recente sono state isolate le EPDC dall'epicardio dell'atrio destro di cuori umani adulti e l'immunofenotipizzazione ha rivelato che esse esprimono molecole di superficie quali CD44 (recettore dell'acido ialuronico), CD90 (thy-1), CD105 (endogлина), HLA-ABC ad alti livelli e CD46 (MCP, proteina cofattoriale di membrana del sistema del complemento) a bassi livelli. Inoltre mediante analisi con RT-PCR si è visto che le EPDC esprimono geni codificanti per la Troponina T cardiaca, GATA4, Mef2C e Connexina 43.

Le EPDC umane messe in coltura vanno incontro spontaneamente a transizione e differenziano innanzitutto in cellule muscolari lisce. Ciò è stato dimostrato transfettando le cellule con un vettore adenovirale che esprime la miocardina, principale regolatore dell'espressione di geni per le cellule muscolari lisce. Le cellule transfettate esprimono i geni per la catena pesante della miosina anche se non riescono ancora ad assemblarne i filamenti neosintetizzati.

Le EPDC in coltura però non adottano un fenotipo endoteliale o forse perdono tale capacità; in appropriate condizioni di crescita esse possono differenziare in osteoblasti ma non in adipociti (20).

Recentemente è stato osservato che le EPDC umane iniettate nel miocardio infartuato di topi immunodeficienti migliorano la funzione cardiaca, incrementando l'angiogenesi e riducendo il rimodellamento patologico (21).

Tali effetti sembrerebbero mediati dalla timosina  $\beta 4$  che stimola le EPDC a differenziare in cellule muscolari lisce e cellule endoteliali dando origine a nuovi vasi, indispensabili per la sopravvivenza e la rigenerazione del miocardio post-ischemico (22).

Ciò ha portato a considerare le EPDC come una nuova popolazione di cellule progenitrici nel cuore umano che affiancherebbe le cellule staminali ematopoietiche, i progenitori delle cellule endoteliali e i progenitori delle cellule cardiache.

## 1.2. CELLULE STAMINALI CARDIACHE

Studi recenti condotti su modelli animali e sull'uomo hanno mostrato che sia i cardiomiociti che le cellule vascolari possono rigenerarsi de novo nel cuore adulto, confutando il paradigma secondo il quale il cuore sarebbe un organo post-mitotico costituito da cellule terminalmente differenziate che svolgono la loro funzione per tutta la durata della vita (23).

La dimostrazione che nell'uomo piccoli miociti possono dividersi ed amplificarsi in seguito ad infarto (24,25) o ad un sovraccarico pressorio (26,27), e l'evidenza che il cuore di mammifero possiede un comparto di cellule staminali hanno portato a considerare la possibilità di ricostituire, dopo un infarto, il miocardio necrotico e di riparare la dilatazione e l'assottigliamento della parete ventricolare.

Cellule staminali cardiache (CSCs) identificate per l'espressione di antigeni di staminalità, c-kit (*recettore per lo Stem Cell Factor*), MDR-1 (*Multi Drug Resistance Protein*) e Sca-1 (*Stem Cell Antigen*) sono state ritrovate nel cuore di diverse specie di mammifero; tali cellule presentano proprietà tipiche delle cellule staminali, poiché sono multipotenti, clonogeniche e capaci di autorinnovarsi (28).

Anche nell'uomo sono state isolate, dal miocardio adulto, cellule staminali positive per c-kit, anche noto come CD117, che sono capaci di differenziare nelle tre principali linee cellulari cardiache. Tali cellule se iniettate localmente nel miocardio infartuato di topi immunodeficienti e ratti immunosoppressi sono capaci di rigenerare il tessuto danneggiato dando origine a nuovi cardiomiociti e cellule dei vasi coronarici (29).

Sebbene sia stata ormai accertata l'esistenza di una popolazione di CSCs nel cuore umano adulto, ancora molto discussa resta la loro origine. Alcuni Autori sostengono che si tratti di cellule staminali cardiache residenti che si formano durante lo sviluppo embrionale cardiaco e permangono *in situ* in uno stato indifferenziato concentrandosi principalmente nell'apice e nell'atrio (30,31); inoltre recentemente diversi studi hanno portato a considerare l'epicardio come una possibile riserva di cellule staminali multipotenti (32,33).

Al contrario studi condotti su pazienti trapiantati *sex-mismatched* supportano l'ipotesi di un'origine extracardiaca secondo la quale le CSCs deriverebbero dal midollo osseo e migrerebbero nel sito di danno in seguito ad un'opportuna stimolazione (34,35).

Tuttavia recenti approcci sperimentali *in vitro* hanno dimostrato una correlazione fra queste due ipotesi, in quanto sembrerebbe che cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo promuovano la proliferazione ed il differenziamento delle CSC residenti, attraverso un meccanismo paracrino (36,37).

## 2. SCOPO

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di stabilire se le cellule mesoteliali del cuore umano adulto mantengono le potenzialità che presentano durante la vita embrionale e più precisamente se vadano incontro ad EMT generando la popolazione delle cellule staminali cardiache CD117 positive.

Numerosi dati presenti in letteratura hanno ormai dimostrato la multipotenzialità delle cellule derivate dall'epicardio. Inoltre recentemente è stata descritta una localizzazione preferenziale della popolazione di cellule staminali cardiache, CD117 positive, nel subepicardio del cuore umano adulto.

Da tali premesse nasce l'idea di stabilire se l'origine delle cellule staminali cardiache possa coinvolgere l'epicardio attraverso una transizione epitelio-mesenchimale.

Allo scopo di valutare questa ipotesi e stabilire un possibile legame tra l'epicardio, le EPDC e le cellule staminali cardiache, sono stati condotti studi *in vivo* e *in vitro* sulle cellule dell'epicardio, derivate da cuori umani adulti normali e patologici con cardiomiopatia post-ischemica.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. MATERIALI

Frammenti a tutto spessore della parete cardiaca di ventricolo destro, apice, atrio, giunzione atrio-ventricolare e ventricolo sinistro sono stati prelevati da cuori di soggetti adulti deceduti per cause non cardiovascolari (n=11, età media 41±12 anni, 7 maschi e 4 femmine) e da cuori di pazienti sottoposti a trapianto per insufficienza cardiaca post-ischemica cronica in fase terminale (n=20, età media 55±5,5 anni, 14 maschi e 6 femmine, frazione di eiezione media 25±1%).

Dopo lavaggio in soluzione fisiologica i campioni sono stati divisi e i due frammenti ottenuti sono stati processati per l'allestimento di colture cellulari e per l'analisi immunohistochimica. Dal frammento destinato allo studio *in vitro* l'epicardio, separato dalle tonache più interne, è stato messo in coltura sotto un vetrino coprioggetto sterile. Il frammento per l'immunohistochimica è stato fissato in formalina tamponata al 10% per 24 ore, incluso in paraffina e quindi tagliato al microtomo in sezioni seriate dello spessore di 4 µm che sono state montate su vetrini portaoggetto.

#### 3.2. IMMUNOISTOCHEMICA

Prima di procedere alla colorazione la paraffina è stata rimossa mediante incubazione delle sezioni a 70°C per 30 min, seguita da lavaggi in xylene e reidratazione con etanolo a concentrazioni decrescenti (da 96 a 80%) fino ad immersione in H<sub>2</sub>O distillata.

Dopo sparaffinatura i vetrini sono stati pretrattati in forno a microonde per 10-17 min in tampone citrato (Ph 6.0) per lo smascheramento dei siti antigenici di CK 5/6, POD-1 e Tie2. Lasciati raffreddare e lavati in PBS, alcuni vetrini sono stati colorati usando un kit di rivelazione (Millipore, USA), basato sul sistema biotina-streptavidina e il protocollo fornito dalla casa produttrice; mentre altri sono stati incubati per 30-60 minuti a temperatura ambiente con siero di asino per bloccare i legami aspecifici e poi con gli anticorpi primari per 60 min a 37° C. Sono stati usati anticorpi primari per il riconoscimento di:

- BVES (Blood Vessel Epicardial Substance): marcatore delle cellule epicardiche (capra, 1:10, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Tie-2: recettore dell'angiopoietina espresso dalle cellule in transizione (coniglio, 1:10, Santa Cruz Biotechnology)
- CK 5/6: citocheratina tipica delle cellule mesoteliali (capra, 1:10, Santa Cruz Biotechnology)

- POD-1: fattore di trascrizione la cui espressione è indotta dai fattori di crescita che stimolano l'EMT (capra 1:10, Santa Cruz Biotechnology)

per identificare la popolazione mesoteliale non ancora in transizione (BVES, CK 5/6 positiva) e quella in transizione (POD-1, Tie-2 positiva).

I vetrini sono stati, quindi, lavati in PBS e poi incubati per 60 min a 37°C con gli anticorpi secondari sviluppati in asino, IgG anti-coniglio e anti-capra coniugati con fluoresceina. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS i vetrini sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente con il colorante nucleare DAPI. Infine le sezioni sono state ricoperte con una soluzione di montaggio, il Vectashield (Vector Laboratories, USA), e con il vetrino coprioggetto. L'osservazione è avvenuta con un microscopio Leica DMLB equipaggiato per l'epifluorescenza e connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica DC200.

### 3.2.1. *BLU DI TOLUIDINA*

Per identificare i mastociti nei campioni tissutali, le sezioni sono state sparaffinate ed incubate per 5 min con blu di toluidina allo 0.2%. Infine, dopo lavaggio e rapida disidratazione le sezioni sono state montate con una resina sintetica (Entellan, Merck-Germany) e ricoperte con il vetrino coprioggetto.

## 3.3. *COLTURE CELLULARI*

### 3.3.1. *FORMAZIONE DELLA MATRICE EXTRACELLULARE IN VITRO*

Fibroblasti cardiaci sono stati isolati da frammenti tissutali derivati da cuori umani adulti con cardiomiopatia post-ischemica, mediante digestione enzimatica con tripsina allo 0,25% (Sigma-Aldrich, USA) e collagenasi II allo 0,1% (MP Biomedicals, Germany), seguita da una selezione positiva immunomagnetica con *Micro Beads* anti fibroblasti, seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice (Miltenyi Biotec, Germany). La frazione cellulare positiva è stata piastrata nel mezzo di coltura DMEM (Sigma-Aldrich), con l'aggiunta di siero fetale bovino al 10%, penicillina G (100U/ml) e streptomycina (100 µg/ml) (Invitrogen, USA), e mantenuta in confluenza per 21 giorni, tempo necessario per favorire la deposizione della matrice.

Successivamente i fibroblasti sono stati rimossi con un metodo non enzimatico mediante lavaggi ripetuti con EDTA 0,5 mM (Sigma-Aldrich) e la presenza della matrice sulle piastre è stata confermata all'immunofluorescenza.

### 3.3.2. ISOLAMENTO DELLE CELLULE CD117 POSITIVE

Le cellule CD117(+) sono state isolate da frammenti tissutali derivati da cuori umani adulti normali e con cardiomiopatia post-ischemica mediante digestione enzimatica con tripsina allo 0,25% (Sigma-Aldrich) e collagenasi II allo 0,1% (MP Biomedicals).

La popolazione cellulare, CD117(+), è stata quindi purificata mediante selezione positiva immunomagnetica, utilizzando *Micro Beads* anti CD117, seguendo il protocollo della ditta fornitrice (Miltenyi Biotec).

L'efficacia della separazione delle cellule CD117(+) è stata confermata mediante immunofluorescenza. Inoltre le cellule isolate sono state sottoposte ad analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR.

### 3.3.3. COLTURA DELLE CELLULE DELL'EPICARDIO IN VITRO

Per ottenere la crescita del foglietto epiteliale *in vitro*, l'epicardio è stato messo in coltura sotto un vetrino coprioggetto sterile in piastre ricoperte dalla matrice extracellulare sintetizzata dai fibroblasti cardiaci, nel mezzo di coltura DMEM (Sigma-Aldrich), con l'aggiunta di siero fetale bovino al 2% e di penicillina G (100U/ml) e streptomycina (100 µg/ml) (Invitrogen).

Il terreno di coltura è stato cambiato due volte a settimana e le piastre sono state osservate periodicamente al microscopio a contrasto di fase. La crescita delle cellule epiteliali e la formazione di un foglietto epiteliale integro è stata osservata in un tempo variabile da tre a sette giorni.

Nelle cellule che formavano il foglietto epiteliale è stata quindi stimolata la transizione aggiungendo al mezzo di coltura il fattore di crescita TGFβ1 (Transforming Growth Factor β1, 3nM, Peprotech, UK) per 24 ore.

Sia le cellule epiteliali sia le EPDC derivate da transizione sono state sottoposte a colorazioni di immunocitochimica e ad analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR.

### 3.4. IMMUNOCITOCHIMICA

Per la caratterizzazione fenotipica e per la conferma dell'avvenuta EMT *in vitro*, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4%. Dopo incubazione con siero di asino per bloccare gli eventuali legami aspecifici, le cellule sono state incubate per un'ora a 37°C con anticorpi primari contro marcatori citoplasmatici e di membrana:

- CD117: recettore per lo *stem cell factor*, marcatore di staminalità (topo 1:25, Chemicon, Europe)

- CD90: recettore transmembrana, marcatore delle cellule mesenchimali (topo 1:20, Chemicon)
- $\beta$ -catenina: (topo 1:30, Santa Cruz Biotechnology)
- CK 5/6: citocheratina, marcatore delle cellule mesoteliali (capra 1:10, Santa Cruz Biotechnology)
- E-caderina: (marcatore delle cellule epiteliali, topo 1:10, Chemicon)

Dopo lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate per un'ora a 37°C con anticorpi secondari sviluppati in asino, IgG anti-coniglio, anti-topo e anti-capra, coniugati con fluoresceina o rodamina (Jackson ImmunoResearch, UK). Dopo un ulteriore lavaggio in PBS le cellule sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con il colorante nucleare DAPI ed infine ricoperte con una soluzione di montaggio, il Vectashield (Vector Laboratories), e con vetrini coprioggetto.

L'osservazione è avvenuta con un microscopio Leica DMLB equipaggiato per l'epifluorescenza e connesso ad un PC attraverso una fotocamera digitale Leica DC200.

### 3.5. RT PCR

Date le difficoltà riscontrate nella manipolazione di campioni come l'epicardio, che possiede un'abbondante connettivo adiposo sotto un esile mesotelio, sono stati testati diversi metodi di estrazione di RNA da cellule e tessuti.

Il risultato migliore è stato ottenuto utilizzando l'*Isol-RNA Lysis Reagent* (5Prime, Germany) una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, che ha la duplice funzione di lisare le cellule e preservare l'integrità dell'acido ribonucleico, proteggendolo dall'azione delle Rnasi. L'estrazione dell'RNA è stata ottenuta seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Gli RNA estratti sono stati dosati al NanoVue (GE Healthcare, Germany) e sono stati sottoposti ad un'analisi qualitativa, caricando 3  $\mu$ g di ogni campione su gel di agarosio e formaldeide.

Dimostrata l'integrità degli RNA, ciascun campione è stato retrotrascritto da 1  $\mu$ g di RNA utilizzando il kit di retrotrascrizione *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Germany).

Il cDNA ottenuto da ciascun campione è stato amplificato mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizzando il kit di amplificazione *5Prime Hot MasterMix* (5Prime) e primers specifici per marcatori mesoteliali (BVES, CK5, E-caderina) e mesenchimali (vimentina, M-caderina), per marcatori di transizione (Podoplanina e Tie-2) e per il marcatore di staminalità CD117.

Tutti i primers sono stati disegnati con il software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) e le relative sequenze sono riportate in tabella 1.

I prodotti di amplificazione sono stati quindi analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%, e le relative bande sono state visualizzate e fotografate con il sistema di acquisizione *Fire Reader XS D-55* dotato del software 1D (UVItec Limited, UK). L'intensità delle bande è stata determinata usando il software *ImageJ* (NIH, USA) ed i livelli di espressione dei geni sono stati valutati attraverso rapporto densitometrico tra il cDNA da analizzare e il GAPDH scelto come gene housekeeping.

Inoltre, nelle cellule CD117 positive isolate dai cuori umani adulti normali e con cardiomiopatia post-ischemica, è stata analizzata l'espressione dei geni coinvolti nel *pathway* del TGF $\beta$ , mediante PCR Array ( Human TGF $\beta$  BMP Signaling PCR Array ).

Gli RNA estratti dalle cellule e successivamente retrotrascritti a cDNA sono stati amplificati in piastre da 96 pozzetti contenenti in forma liofilizzata una miscela di primers specifici per i geni coinvolti nel *pathway*, seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice (SABiosciences, USA).

### 3.6. ANALISI STATISTICA

Per il confronto dei risultati ottenuti da due differenti gruppi è stata effettuata l'analisi statistica mediante test t Student e le differenze sono state considerate significative con valori di "p" inferiori a 0.05.

## 4. RISULTATI

### *4.1. DIVERSA LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE DELL'EPICARDIO E DEL SUBEPICARDIO NEI CUORI NORMALI E PATOLOGICI*

Dall'analisi immunoistochimica *in vivo* è emerso che, cellule positive per marcatori epiteliali sono localizzate prevalentemente a livello del mesotelio ed in minima parte nel subepicardio dei cuori normali, mentre cellule positive per marcatori di transizione sono distribuite prevalentemente nel subepicardio.

Nei cuori patologici non è visibile lo strato di cellule mesoteliali e tanto i marcatori specifici di tali cellule quanto quelli delle cellule in transizione sono espressi dalle cellule localizzate nel subepicardio.

Nei cuori normali BVES mostra una localizzazione in sede mesoteliale lungo la superficie di contatto tra le cellule. Nei pazienti con insufficienza cardiaca cronica invece le cellule epiteliali perdono i reciproci contatti, le giunzioni si disassemblano e BVES presenta un pattern granulare (figura 4 C-D).

Cellule epiteliali positive per CK 5/6 sono localizzate nell'epicardio e nel subepicardio dei cuori normali, mentre nei cuori in scompenso le poche cellule positive per tale marcatore sono localizzate esclusivamente nel subepicardio (figura 4 E-F).

E' stato inoltre osservato che nei cuori normali sia le cellule mesoteliali sia le cellule del subepicardio mostrano positività per marcatori di EMT quali POD-1 e Tie-2, mentre nei cuori in scompenso cellule positive per tali marcatori si riscontrano esclusivamente nel subepicardio (figura 5).

I dati ottenuti all'immunoistochimica sono stati confermati dall'analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR. Da tale studio, infatti, è emerso che geni codificanti per gli antigeni epiteliali (BVES, Citocheratina 5 ed E-caderina) sono maggiormente espressi nell'epicardio e nel subepicardio dei cuori normali, mentre la loro espressione è marcatamente ridotta nei cuori con cardiomiopatia post-ischemica.

Inoltre, nei cuori patologici è stata osservata un'aumentata espressione dei geni codificanti per gli antigeni mesenchimali e per i marcatori di transizione (M-caderina, vimentina, Tie-2).

Anche l'espressione del recettore di superficie CD117, marcatore tipico delle cellule staminali cardiache, è risultata essere 6.61 volte (n=3, p<0.05) più alta nei cuori patologici rispetto ai cuori normali (figura 6).

#### 4.2. LE CELLULE EPICARDICHE DEL CUORE UMANO ADULTO VANNO INCONTRO A TRANSIZIONE IN VITRO ED ESPRIMONO CD117

I frammenti di epicardio messi in coltura su piastre rivestite dalla matrice extracellulare sintetizzata e secreta dai fibroblasti cardiaci, hanno dato origine ad un foglietto di cellule epiteliali poligonali, fittamente stipate e strettamente unite mediante complessi giunzionali (figura 7A). Tali cellule mostrano all'immunofluorescenza una localizzazione di membrana della  $\beta$ -catenina e della E-caderina che marcano i contatti tra le cellule (figure 8A - 8C).

L'aggiunta del fattore TGF $\beta$ 1 alle cellule epiteliali in coltura, ha stimolato la loro transizione. Esse assumono infatti caratteristiche fenotipiche proprie delle cellule mesenchimali, quali forma irregolare, fusata o stellata, perdita dei contatti intercellulari e acquisizione di capacità migratorie (figura 7B). In tali cellule è stata osservata una diversa distribuzione della  $\beta$ -catenina, che migra dalla membrana nel citoplasma o nel nucleo, e l'acquisizione di marcatori tipici delle cellule mesenchimali (figura 8B).

I risultati ottenuti all'immunofluorescenza sono stati confermati dall'analisi dell'espressione genica sulle cellule in coltura prima e dopo aver stimolato l'EMT. In seguito alla stimolazione della transizione sono stati infatti osservati un aumento di 1,84 volte (n=4, p<0.05) dell'espressione di vimentina e di M-caderina, e una diminuzione dell'espressione di E-caderina e di citocheratina 5 rispettivamente di 2,27 volte e di 5 volte (n=4, p<0.05) (figura 9).

Le EPDC, ottenute dalla transizione delle cellule dell'epicardio *in vitro*, mostrano positività anche per il marcatore di staminalità CD117 (figura 8D), la cui espressione risulta aumentata rispetto a quella riscontrata nelle cellule epiteliali.

Nelle cellule CD117 positive è stato inoltre osservato un livello di espressione dei geni codificanti per la E-caderina, la citocheratina5 e la vimentina sovrapponibile a quello delle EPDC (figura 9).

Dall'analisi dell'espressione genica delle cellule CD117 positive derivate dai cuori con cardiomiopatia post-ischemica mediante PCR Array, è stata infine osservata l'attivazione dell'EMT, evidenziata da un'aumentata espressione dei geni codificanti per i fattori di crescita TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3, Nodal, ID1 e cMyc, coinvolti nel pathway del TGF $\beta$ , rispetto alle cellule isolate dai cuori normali (figura 10).

## 5. DISCUSSIONE

Numerosi dati presenti in letteratura hanno ormai dimostrato l'importanza della transizione epitelio-mesenchimale nell'organogenesi cardiaca. Nel cuore, durante il *looping stage*, il miocardio secrene fattori che stimolano l'EMT sia nell'endocardio che nell'epicardio. La transizione endocardica porta alla formazione dei cuscinetti endocardici e delle valvole atrioventricolari (6), mentre le cellule epicardiche che vanno incontro a transizione generano le EPDC (4).

L'epicardio è una membrana sottile e trasparente che riveste esternamente il miocardio ed è costituito da un singolo strato di cellule mesoteliali appiattite che poggia su una sottile lamina di tessuto connettivo denso. Durante lo sviluppo embrionale nei mammiferi l'epicardio origina dall'organo proepicardiale, una struttura composta da un singolo strato di cellule epiteliali, raggomitolato a forma di grappolo d'uva. Gran parte di queste cellule migrano dall'epicardio primitivo verso il subepicardio e va incontro a transizione epitelio-mesenchimale, generando una popolazione di cellule note come EPDC.

Le EPDC sono cellule multipotenti che danno origine a cardiomiociti, ai fibroblasti cardiaci e a componenti del sistema dei vasi coronarici, contribuendo in tal modo alla regolazione dello sviluppo miocardico, che risulterebbe alterato in assenza di epicardio (7,38).

Recentemente sono state isolate cellule epicardiche da cuori umani adulti allo scopo di stabilire se le EPDC adulte conservano caratteristiche simili a quelle embrionali. Messe in coltura tali cellule vanno incontro spontaneamente a transizione e danno origine a diversi tipi di cellule mesodermiche, anche se le loro capacità differenziative sono più ristrette di quelle delle cellule staminali mesenchimali (20).

Il subepicardio del cuore umano adulto, come quello dell'embrione, contiene una matrice extracellulare costituita da collagene di tipo I, IV, V, VI, fibronectina, laminina, proteoglicani, vitronectina, elastina e tenascina-X. E' stato dimostrato che sia l'epicardio che il miocardio contribuiscono alla formazione di questa matrice. Inoltre, nello spazio subepicardico si accumulano fattori di crescita derivati dal miocardio, quali *HGF*, *TGFs* e *BMPs*.

Recentemente è stata dimostrata, nel cuore umano adulto, la prevalente distribuzione delle cellule CD117 positive nel subepicardio di cuori espantati per insufficienza cardiaca post-ischemica (33). L'origine di queste cellule è ancora molto discussa, alcuni Autori sostengono che si tratti di cellule staminali cardiache residenti che si formano durante lo sviluppo embrionale cardiaco e permangono *in situ* in uno stato indifferenziato concentrandosi principalmente nell'apice e nell'atrio (30,31); al

contrario studi condotti su pazienti trapiantati *sex-mismatched* supportano l'ipotesi di un'origine extracardiaca secondo la quale le CSCs deriverebbero dal midollo osseo e migrerebbero nel sito di danno in seguito ad un'opportuna stimolazione (34,35).

Tuttavia i risultati del presente studio sembrano confermare l'ipotesi che le cellule dell'epicardio e l'EMT rappresentano la fonte delle cellule CD117 positive descritte nel cuore umano adulto. Pertanto, le EPDC e le cellule CD117 positive potrebbero rappresentare stadi differenziativi successivi della stessa popolazione di cellule staminali cardiache residenti.

La presenza nel subepicardio di cuori normali delle cellule positive per marcatori epiteliali, come la CK 5/6, dimostra che le cellule dello strato epiteliale dell'epicardio migrano attraverso la membrana basale, dimostrando cioè proprietà tipiche delle cellule mesenchimali. La localizzazione delle cellule positive per POD-1 e Tie-2 nel mesotelio e nel subepicardio conferma l'esistenza di una subpopolazione di cellule epiteliali che va incontro ad EMT. Inoltre la perdita del mesotelio dall'epicardio e la presenza di cellule che esprimono marcatori di transizione nel subepicardio in cuori con insufficienza cardiaca cronica post-ischemica rappresentano un'ulteriore conferma del verificarsi dell'EMT nelle cellule dell'epicardio.

E'ormai noto che l'interazione delle cellule con le diverse componenti della matrice extracellulare influenza la biologia e il destino cellulare (39). Per tale motivo, per permettere un adattamento ottimale delle cellule in coltura, è stata utilizzata come supporto colturale una matrice extracellulare sintetizzata dai fibroblasti cardiaci *in vitro*. In tali condizioni le cellule epicardiche hanno formato un foglietto epiteliale integro come è stato possibile notare dalla localizzazione di membrana della  $\beta$ -catenina e della E-caderina.

In queste cellule è stata quindi stimolata la transizione mediante l'aggiunta di TGF $\beta$ , potente induttore dell'EMT in numerose linee cellulari (40). Le alterazioni nella morfologia cellulare, nella localizzazione e nell'espressione di specifici antigeni hanno fornito una conferma dell'avvenuta transizione. Le cellule perdono i marcatori epiteliali, come la CK 5/6, mostrano una localizzazione nucleare della  $\beta$ -catenina, esprimono marcatori delle cellule mesenchimali, come la vimentina, e mostrano positività per il recettore di superficie CD117, marcatore di staminalità. La positività delle EPDC per il marcatore di membrana CD117 e un profilo di espressione genica sovrapponibile a quello delle cellule CD117 positive, forniscono la prova del coinvolgimento dell'EMT nella generazione della popolazione delle cellule staminali cardiache CD117 positive residenti nel cuore umano adulto.

La necessità di utilizzare la matrice extracellulare ottenuta dai fibroblasti cardiaci come substrato per ottenere *in vitro* il foglietto epicardico potrebbe essere associata all'importante ruolo svolto dalle proteine della matrice extracellulare, dai fattori di crescita e dalle integrine nell'attivazione degli eventi che portano alla transizione, così come suggerito da studi precedenti (33,41).

Inoltre sembra che l'EMT sia maggiormente attivata in condizioni patologiche come dimostrato dall'accumulo delle cellule CD117 positive nel subepicardio e dalla scomparsa del mesotelio dalla superficie del cuore con cardiomiopatia ischemica. Ciò è stato ulteriormente confermato dall'analisi dell'espressione genica delle cellule CD117 positive isolate dai cuori con cardiomiopatia post-ischemica. In tali cellule è stato infatti osservato un aumento dell'espressione dei geni coinvolti nel *pathway* del TGF $\beta$ .

Pertanto sulla base di questi risultati emerge che le cellule dell'epicardio possono andare incontro a transizione nel cuore umano adulto generando una popolazione di cellule staminali cardiache residenti.

Quindi i risultati del presente lavoro, supportati dai dati presenti in letteratura sulle capacità rigenerative delle EPDC umane nel miocardio infartuato di topi immunodeficienti (21), dimostrano che l'attivazione dell'EMT nel cuore umano adulto svolge un ruolo fondamentale nel *turnover* cellulare cardiaco che permette di rigenerare e conservare il pool di cellule staminali cardiache indispensabili nel processo di riparazione in seguito a danno tissutale.

Negli ultimi anni sono state approvate numerose sperimentazioni in fase pre-clinica e clinica, per l'impiego di diversi tipi di cellule staminali per la rigenerazione del miocardio in seguito ad infarto (42). Tuttavia tali terapie sembrano migliorare solo parzialmente la funzionalità cardiaca, con un lieve incremento della frazione di eiezione. Inoltre le cellule trapiantate risentono dell'ambiente sfavorevole e difficilmente attecchiscono nella zona d'ischemia (43).

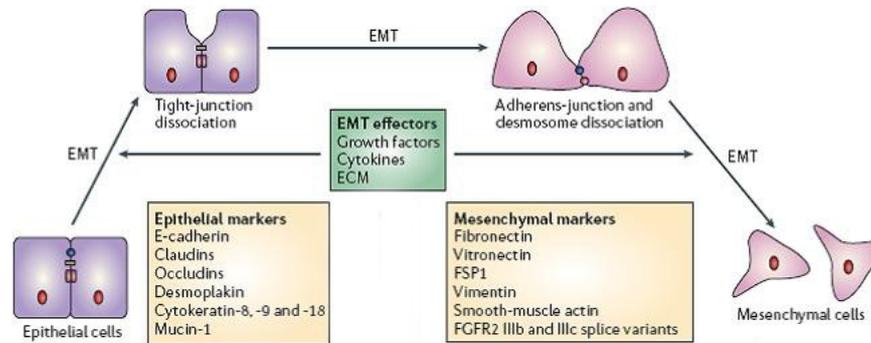
Per tale motivo, è stata analizzata la possibilità di stimolare direttamente *in situ* le cellule staminali cardiache mediante la somministrazione di diversi fattori di crescita. Infatti è stato dimostrato che l'HGF, l'IGF1, l'FGF e l'EGF stimolano la proliferazione, l'attivazione e il reclutamento nel sito di danno delle cellule staminali cardiache residenti (44,45).

Tuttavia, i risultati del presente studio evidenziano una nuova possibilità circa le potenzialità di questi fattori di crescita. Essi infatti potrebbero intervenire nella rigenerazione cardiaca incrementando il pool di cellule staminali cardiache attraverso l'attivazione dell'EMT delle cellule epicardiche.

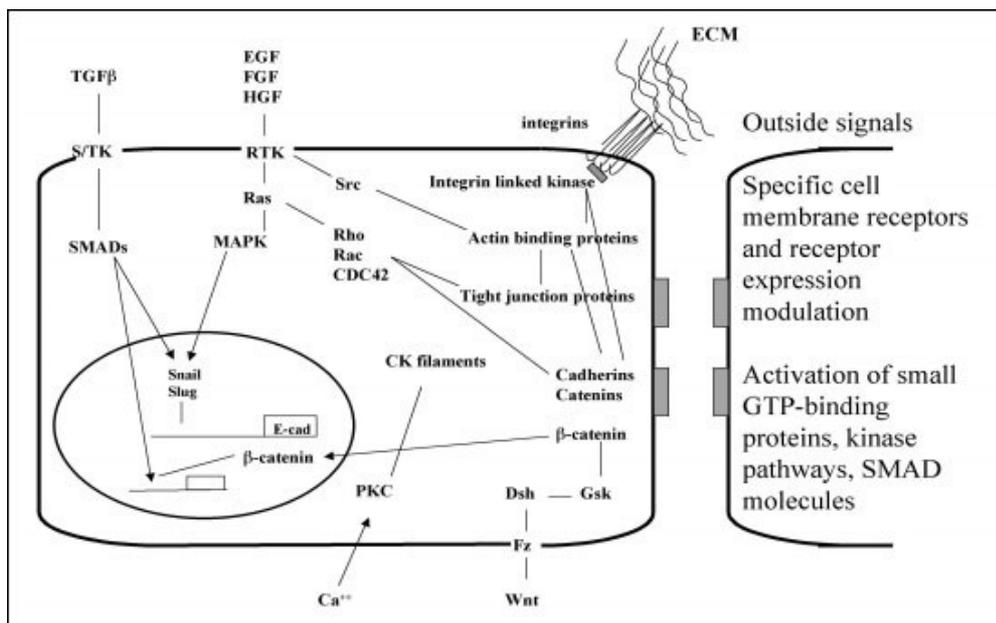
Sebbene nei cuori con cardiomiopatia post-ischemica sia stato dimostrato un aumento del numero delle cellule CD117 positive e l'attivazione del loro potenziale differenziativo, restano da studiare i fattori che ostacolano il processo riparativo in seguito al danno ischemico.

Probabilmente le alterazioni del microambiente extracellulare, quali le variazioni nella composizione della matrice extracellulare e il forte stress ossidativo generati nel sito di danno, compromettono le capacità riparative di tale popolazione cellulare.

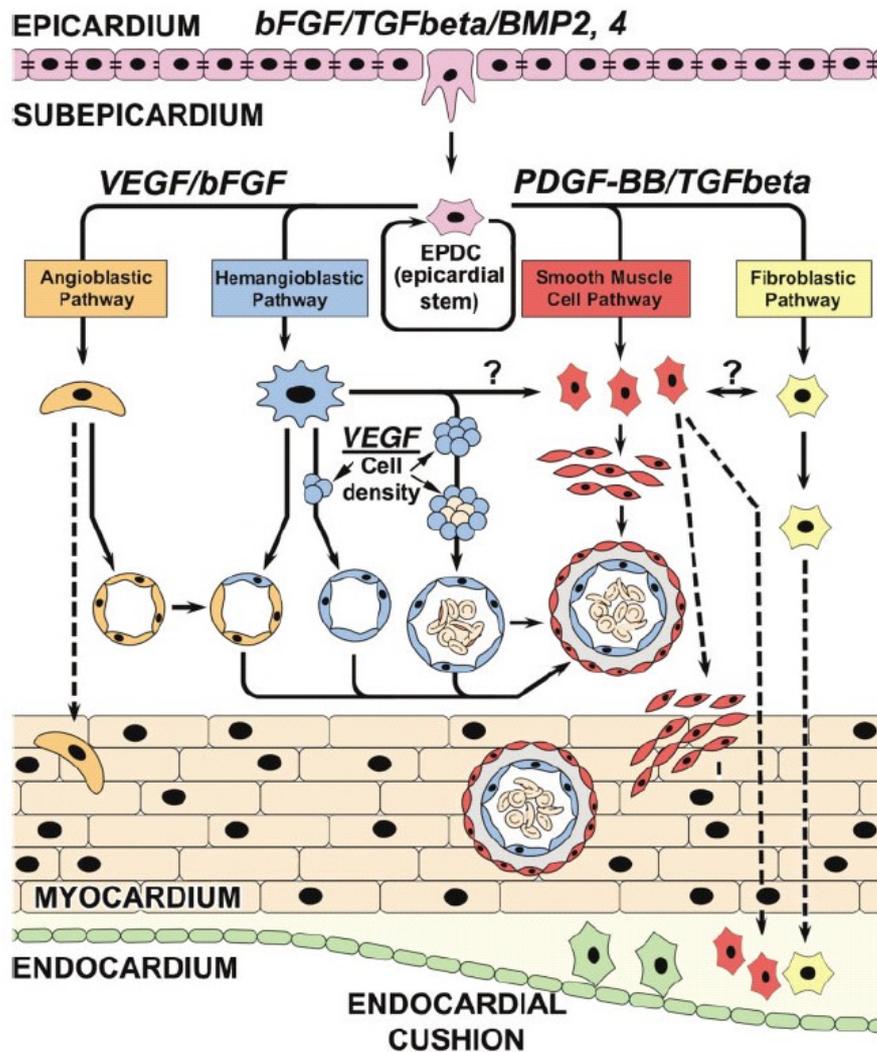
## 6. ICONOGRAFIA



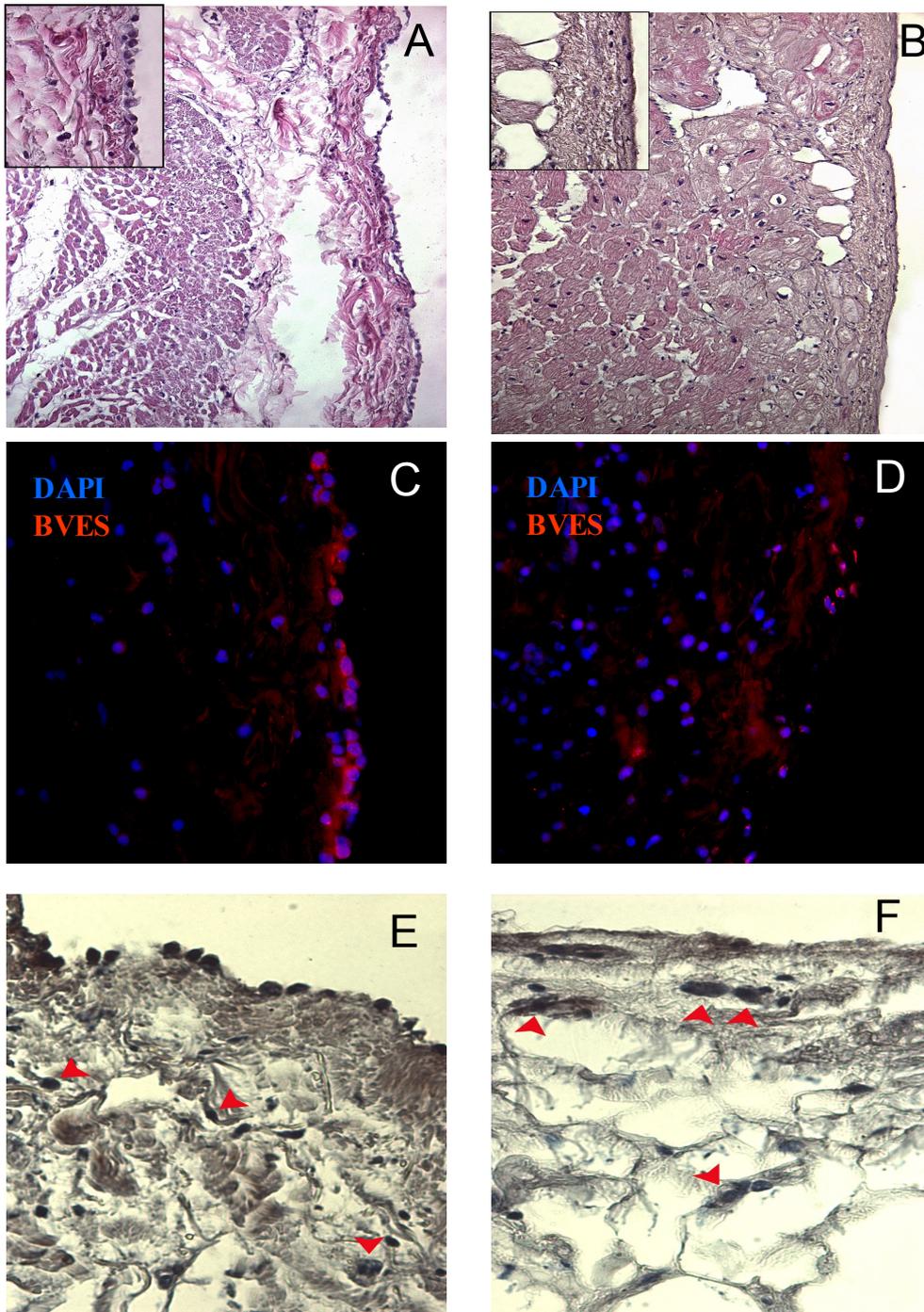
**Figura 1.** Marcatori dell'EMT: le cellule epiteliali in seguito a transizione epitelio-mesenchimale perdono i loro marcatori e acquisiscono marcatori tipici delle cellule mesenchimali.



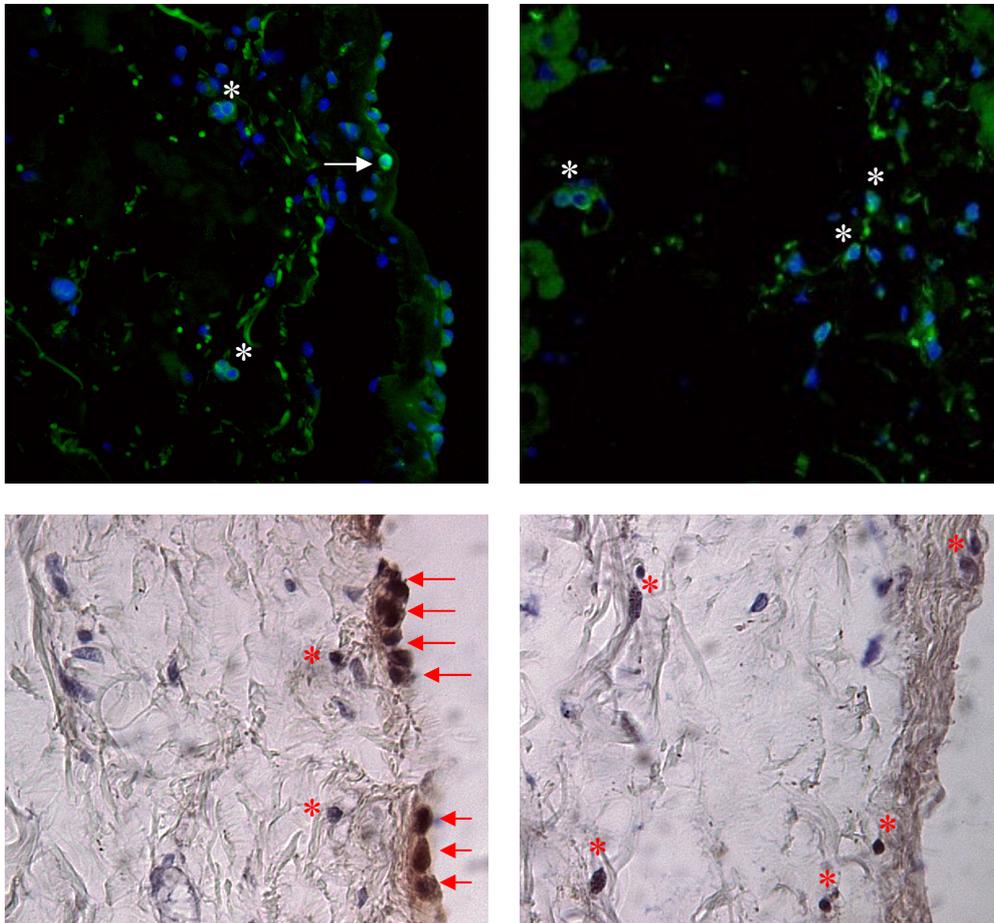
**Figura 2.** Meccanismi molecolari dell'EMT.



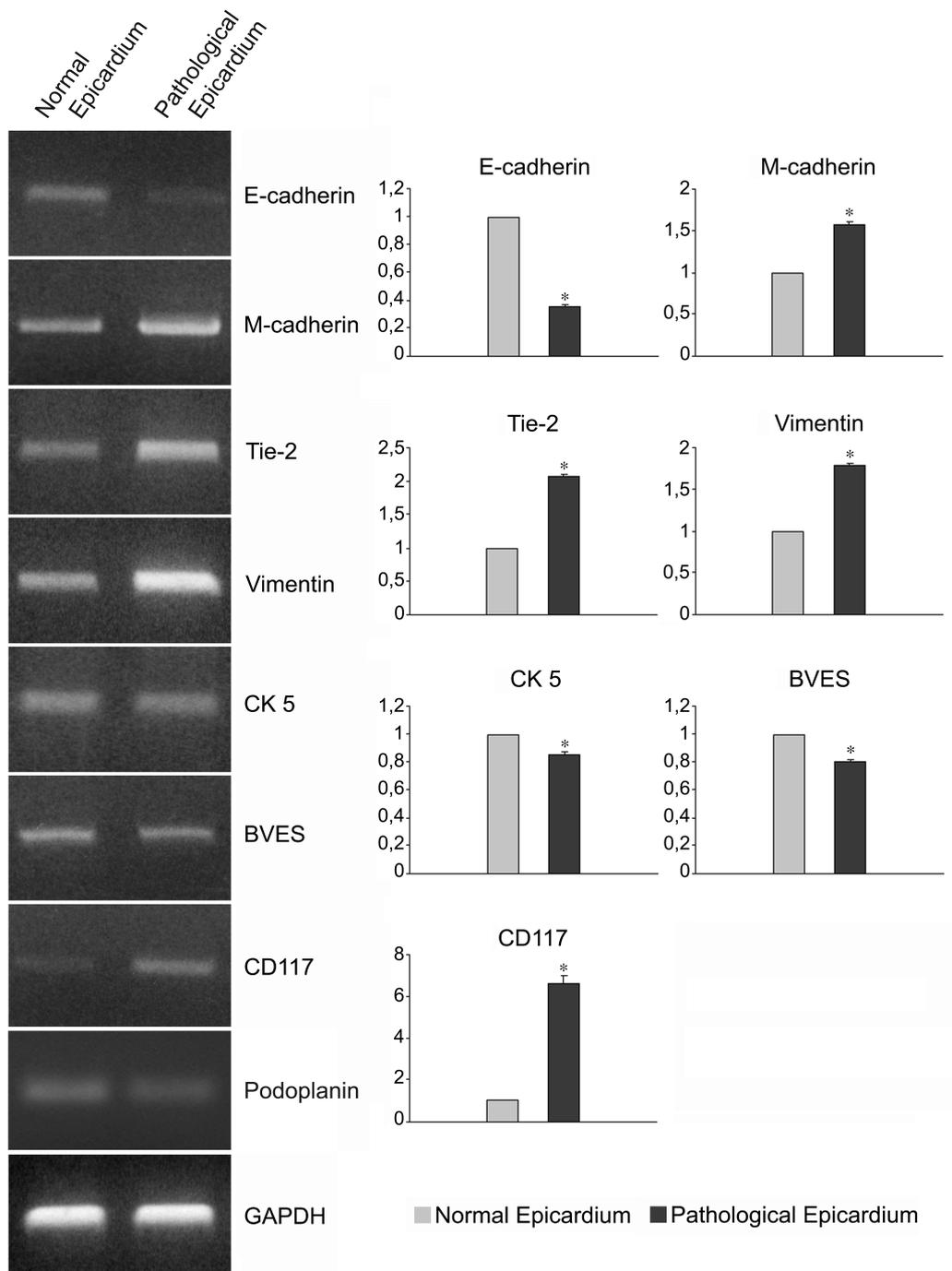
**Figura 3.** Capacità differenziate delle EPDC: le EPDC danno origine a cardiomiociti se stimolate con BMP2, differenziano in cellule endoteliali in presenza di VEGF, in cellule muscolari lisce e fibroblasti se stimolate con PDGF.



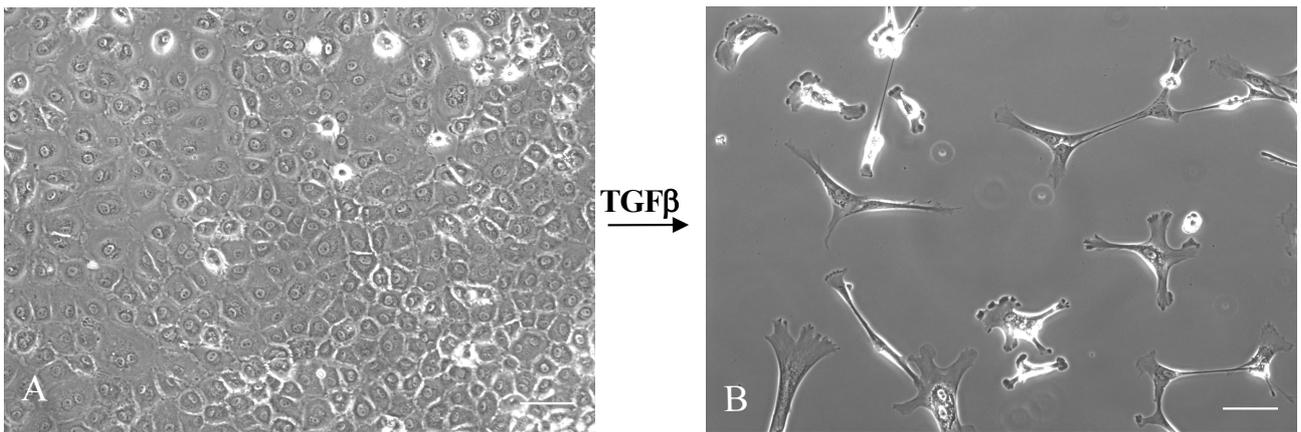
**Figura 4.** Localizzazione delle cellule nell'epicardio e nel subepicardio dei cuori umani adulti normali (a sinistra) e con cardiomiopatia post-ischemica (a destra). Nei cuori normali cellule positive per marcatori epiteliali (BVES-CK5/6) sono localizzate nell'epicardio e in minima parte nel subepicardio (C-E); nei cuori patologici cellule positive per BVES e CK 5/6 sono localizzate esclusivamente nel subepicardio, data l'assenza del mesotelio epicardico (D-F).



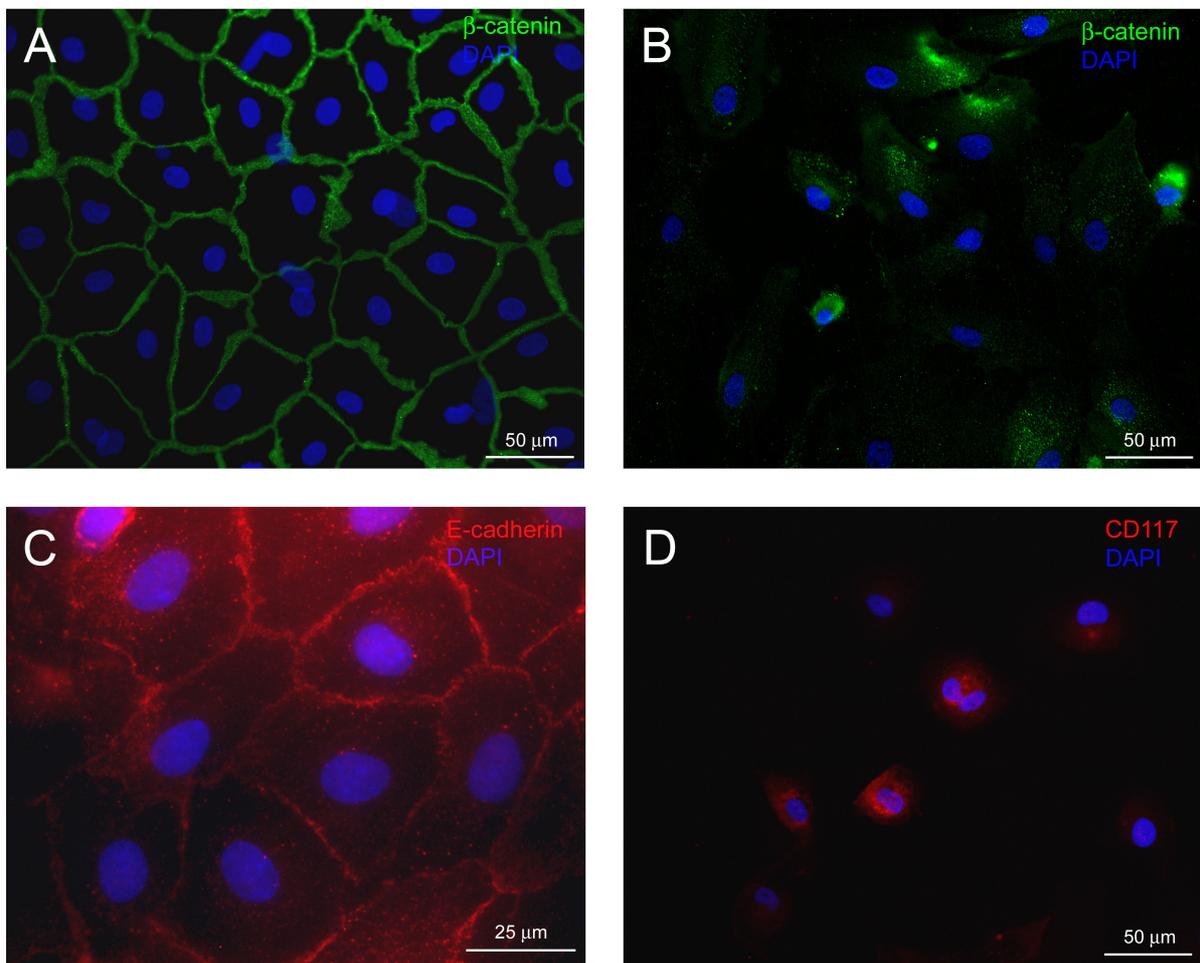
**Figura 5.** Localizzazione delle cellule che esprimono i marcatori di EMT: nel cuore normale (a sinistra) Tie-2 (in alto) e POD-1 (in basso) sono espressi da cellule mesoteliali (freccie) e da cellule presenti nel subepicardio (asterischi). Nel cuore in scompenso (a destra) le cellule positive si riscontrano solo nel subepicardio (asterischi).



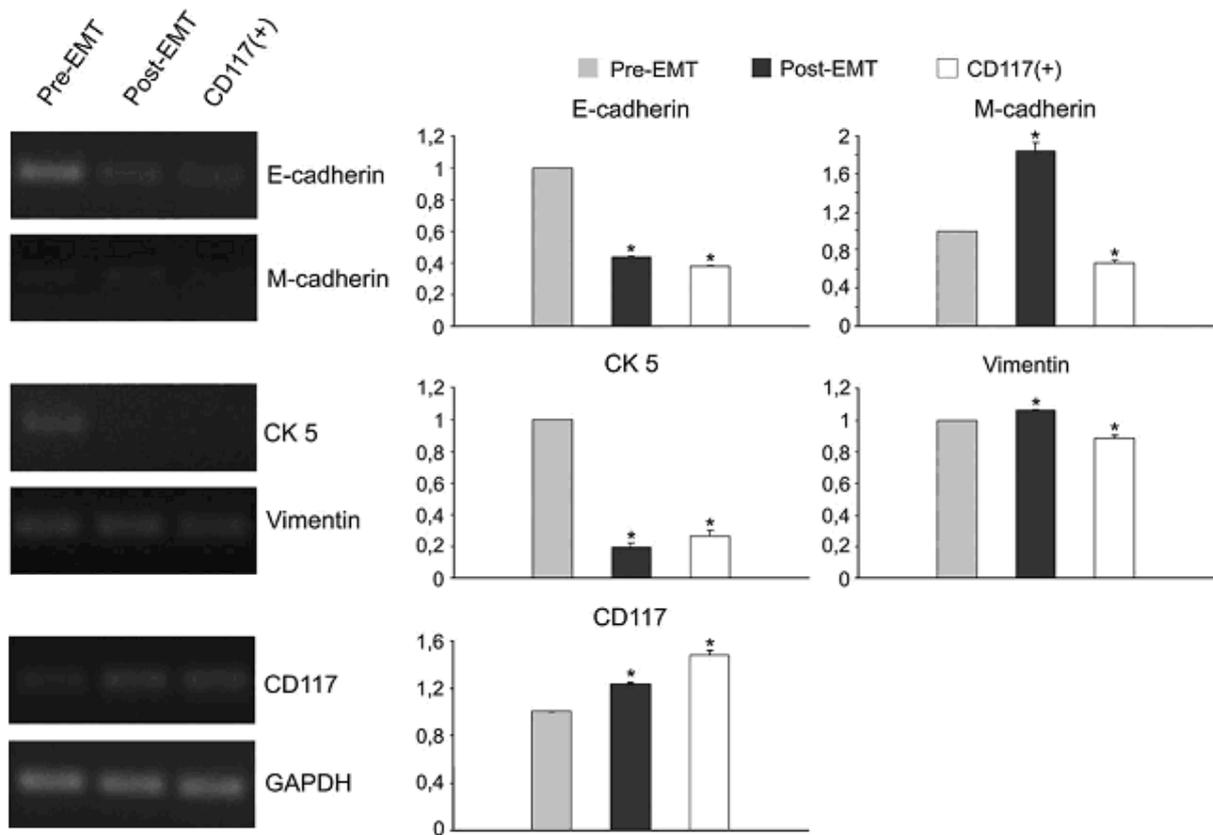
**Figura 6.** Espressione dei marcatori epiteliali e mesenchimali nell'epicardio/subepicardio dei cuori normali e con cardiomiopatia post-ischemica. Geni codificanti per marcatori epiteliali (BVES, CK5/6 ed E-caderina) sono maggiormente espressi nei cuori normali, mentre geni codificanti per antigeni mesenchimali (M-caderina, Tie2 e vimentina) sono più espressi nei cuori patologici. Anche l'espressione di CD117 è maggiore nei cuori patologici rispetto ai cuori normali.



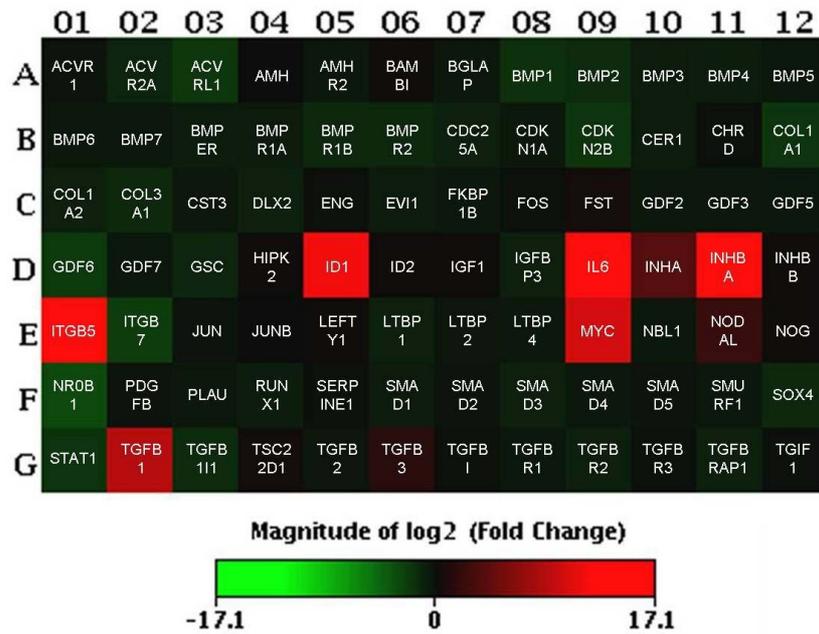
**Figura7.** Colture di cellule dell'epicardio e stimolazione dell'EMT *in vitro*: le cellule epiteliali ottenute da epicardio di atrio normale formano un foglietto epiteliale integro (A). Le giunzioni intercellulari si disassemblano e le cellule perdono le caratteristiche fenotipiche epiteliali dopo stimolazione con TGFβ (B). L'unità di misura nelle immagini corrisponde a 100μm.



**Figura 8.** Localizzazione di membrana della  $\beta$ -catenina e della E-caderina nelle cellule epiteliali che formano il foglietto (A-C). Le EPDC derivate da transizione mostrano una localizzazione nucleare della  $\beta$ -catenina (B) e positività per CD117 (D).



**Figura 9.** Espressione di marcatori epiteliali e mesenchimali nelle cellule epicardiche in coltura, nelle EPDC e nelle cellule CD117 positive isolate da cuori umani adulti con cardiomiopatia post-ischemica. Differenze di espressione dei geni codificanti per la E-caderina, la CK5/6, la M-caderina e la vimentina, sono state riscontrate tra le cellule epicardiche e le EPDC. L'espressione, nelle EPDC, dei geni codificanti per la E-caderina, la CK5/6 e la vimentina rispecchia quella ritrovata nelle cellule CD117 positive.



**Figura 10.** Espressione dei geni coinvolti nel pathway del TGF $\beta$  mediante PCR Array su cellule CD117 positive isolate da cuori normali e cuori con cardiomiopatia post-ischemica. I geni codificanti per TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3 and Nodal, e per i fattori trascrizionali ID1 and c-Myc risultano up-regolati nelle cellule CD117 positive isolate dai cuori patologici.

<b>Primer</b>	<b>Forward sequence</b>	<b>Reverse sequence</b>
BVES	5'-ACCTCAGTTGATGACCGTCTG-3'	5'-AAAGGCACAGGGGTAAATGTT-3'
CD117	5'-AAATGTCACAACAACCTTGA-3'	5'-TTTTCTCCATCGTTTACAAATACTGT-3'
CK5	5'-GCCGCCTGGACTCAGA-3'	5'-TCTCAGCAGTGGTACGCTTG-3'
E-Cad	5'-CAGGAGTCATCAGTGTGGTCA-3'	5'-TGTGCTTAACCCCTCACCTT-3'
VIM	5'-ACCCACTCAAAAAGGACTTC-3'	5'-GGTCATCGTGATGCTGAGAA-3'
M-Cad	5'-GAGAAGACTGATCGCTTCAGG-3'	5'-TCCACAACACTACAATCTCCAGGTC-3'
PDPN	5'-ACGGAGAAAGTGGATGGAGA-3'	5'-AAGACCCCAACTATGATTCCAA-3'
TIE-2	5'-GTCTCTGCTCTCCAGGATGG-3'	5'-TGGCAAATCCACTATCTTTGG-3'
GAPDH	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATG-3'

**Tabella 1:** Sequenze dei primers utilizzati nelle reazioni di RT-PCR

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Acloque H. et al.: Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* 119:1438–1449 (2009).
2. Zeisberg M. and Neilson E.G.: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119:1429–1437 (2009).
3. Hay E.D.: The Mesenchymal Cell, Its Role in the Embryo, and the Remarkable Signaling Mechanisms That Create It. *Dev Dyn* 233: 706-720 (2005).
4. Wessels A. and Pérez-Pomares J.M.: The Epicardium and Epicardially Derived Cells (EPDC) as Cardiac Stem Cells. *Anat Rec* 276: 43-57 (2004).
5. Thiery J.P. and Sleeman J.P.: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Rev* 7: 131-142 (2006).
6. Stevens MV et al.: MEKK3 initiates transforming growth factor beta 2-dependent epithelial-to-mesenchymal transition during endocardial cushion morphogenesis. *Circ Res* 103(12):1430–40 (2008).
7. Zhou B et al.: Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454(7200):109–13 (2008).
8. Liu Y.: Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1-12 (2004).
9. Kalluri R. and Neilson E.G.: Epithelial-to-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-1784 (2003).
10. Strutz F. et al.: Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 130: 393-405 (1995).
11. Yang J. and Liu Y.: Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159: 1465-1475 (2001).
12. Yanez-Mo M. et al.: Peritoneal dialysis and epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 348: 403-413 (2003).
13. Aguilera A. et al.: Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs* 6: 262-268 (2005).
14. Yao H.W. et al.: TGF- $\beta$ 1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sci* 76: 29-37 (2004).

15. Willis B.C. et al.: Induction of epithelial–mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-  $\beta$ 1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166: 1321-1332 (2005).
16. Sleeman J.P.: The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Cancer Res* 157 : 55-81 (2000).
17. De Craene B. et al.: The transcription factor snail induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res* 65: 6237-6244 (2005).
18. Wada A. M. et al.: Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. *Circ Res* 92: 525-531 (2003).
19. Wilm B. et al.: The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Dev Dis* 132: 5317-5328 (2005).
20. Van Tuyn J. et al.: Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells* 25: 271-278 (2006).
21. Gittenberger-de Groot A.C. et al.: Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia. *J Cell Mol Med* 14(5):1056-60 (2010).
22. Smart N. et al.: Thymosin  $\beta$ 4 facilitates epicardial neovascularisation of the injured adult heart. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1194: 97–104 (2010).
23. Leri A. et al.: Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration. *Physiol Rev* 85: 1373-1416 (2005).
24. Beltrami A.P. et al: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 344: 1750-1757 (2001).
25. Kajstura J. et al.: Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Med Sci* 95: 8801-8805 (1998).
26. Anversa P. et al.: Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *J Clin Inv* 85: 994-997 (1990).
27. Urbanek K. et al.: Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy *Proc Nat Acad Sci* 100(18): 10440-10445 (2003).
28. Bollini S. et al.: Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. *J Mol Cell Cardiol* (2010).
29. Bearzi C. et al.: Human Cardiac Stem Cells. *Proc Nat Acad Sci* 104: 14068-14073 (2007).
30. Beltrami A.P. et al.: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763–76 (2003).

31. Urbanek K. et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 102: 8692–7 (2005).
32. Smart N. et al.: Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445:177-82 (2007).
33. Castaldo C. et al.: CD117-positive cells in adult human heart are localized in the subepicardium, and their activation is associated with laminin-1 and alpha6 integrin expression. *Stem Cells* 26(7): 1723–31 (2008).
34. Quaini F. et al.: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346: 5-15 (2002).
35. Deb A. et al.: Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107: 1247–9 (2003).
36. Mouquet F. et al.: Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by selfproliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res* 97: 1090–2 (2005).
37. Nakanishi C. et al.: Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 11–6 (2008).
38. Dettman R.W. et al.: Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 193(2): 169–81 (1998).
39. Steingen C. et al.: Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 44(6): 1072–84 (2008).
40. Zavadil J. and Böttinger E.P.: TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions *Oncogene* 24(37): 5764–74 (2005).
41. Bhowmick N.A. et al.: Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 276(50):46707–13 (2001).
42. Segers V.F. and Lee R.T.: Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* 451: 937–942 (2008).
43. Gonzales C. and Pedrazzini T.: Progenitor cell therapy for heart disease. *Exp Cell Res.* 315(18): 3077-85 (2009).
44. Urbanek K. et al.: Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 97(7): 663-73 (2005).
45. Rosenblatt-Velin N et al.: FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 115(7):1724-33 (2005).

## RINGRAZIAMENTI

Giunta alla fine di questo lavoro penso sia più che giusto spendere due parole anche verso coloro che mi hanno aiutato e sostenuto in questo lungo e talvolta faticoso percorso. E' stata la loro presenza e i loro consigli che mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo importante. In primo luogo desidero ringraziare il mio relatore, la prof.ssa Stefania Montagnani per la sua disponibilità e per i suoi consigli.

Ringrazio in particolare la dott.ssa Castaldo Clotilde, la dott.ssa Di Meglio Franca e la dott.ssa Nurzynska Daria, che con i loro consigli e la loro esperienza mi hanno guidata nella stesura di questa tesi e che mi hanno trasmesso il loro entusiasmo e la loro passione in questo lavoro tanto interessante ma spesso anche molto complicato.

Desidero inoltre ringraziare una serie di persone che in circostanze spesso diverse mi hanno dato serenità, amicizia e supporto morale nell'arco di questo percorso: in primo luogo, la dott.ssa Rita Miraglia, che si è dimostrata un'ottima compagna di avventura, con la quale ho condiviso tutti gli stati d'animo che si sono susseguiti non soltanto durante la stesura di questa tesi ma durante tutto il dottorato, la dott.ssa Nunzia Amatruda e la dott.ssa Anna Esposito che hanno saputo sempre sostenermi nei miei momenti di sconforto.

Infine, un fortissimo ringraziamento per la costante fiducia e il grande affetto va alla mia famiglia, e in particolar modo ai miei genitori, senza i quali non sarei mai potuta arrivare fin qui.