

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Facoltà di Medicina e Chirurgia



**Dottorato di Ricerca in
Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale**

XXIV Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di dottorato

**“Ingegneria del tessuto cardiaco:
strategie sperimentali per la riparazione del danno
miocardico irreversibile in un modello animale”.**

TUTOR:
Chiar.mo Prof.
Carlo Vosa

CANDIDATA:
Dott.ssa Antonia Alfano

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE.....	Pag. 3
MATERIALI E METODI	
• <i>Preparazione delle membrane a base di collagene.....</i>	<i>Pag. 11</i>
• <i>Test enzimatici.....</i>	<i>Pag. 13</i>
• <i>Caratterizzazione meccanica</i>	<i>Pag. 13</i>
• <i>Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e Microscopia Elettronica a Scansione Ambientale (ESEM).....</i>	<i>Pag. 14</i>
• <i>Isolamento delle cellule neonatali di ratto.....</i>	<i>Pag. 14</i>
• <i>Semina delle cellule contrattili sulle membrane di collagene.....</i>	<i>Pag. 14</i>
• <i>Valutazione della contrazione delle membrane</i>	<i>Pag. 15</i>
• <i>Modello animale di infarto miocardico.....</i>	<i>Pag. 15</i>
• <i>Protocollo di trapianto.....</i>	<i>Pag. 17</i>
• <i>Valutazione della funzione cardiaca</i>	<i>Pag. 17</i>
• <i>Istologia ed immunofluorescenza delle membrane contrattili in vitro e dei cuori espianati</i>	<i>Pag. 18</i>
RISULTATI E DISCUSSIONE	
• <i>Membrane a base di collagene.....</i>	<i>Pag. 20</i>
• <i>Test di interazione tra le cellule contrattili e le membrane a base di collagene</i>	<i>Pag. 22</i>
• <i>Immunofluorescenza delle membrane in vitro</i>	<i>Pag. 23</i>
• <i>Esperimenti in vivo</i>	<i>Pag. 24</i>
• <i>Istologia ed Immunofluorescenza dei cuori espianati.....</i>	<i>Pag. 25</i>
CONCLUSIONI.....	Pag. 27
BIBLIOGRAFIA	Pag. 29
TABELLE E FIGURE	Pag. 34

INTRODUZIONE

La cardiopatia ischemica rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati (Fonarow, 2007) ed in futuro avrà un impatto sempre maggiore in considerazione del progressivo aumento dell'età media della popolazione (Lee et al., 2004). Negli Stati Uniti ogni anno muoiono per cardiopatia ischemica circa 500.000 persone e la prevalenza della malattia è di oltre 5 milioni di individui. In Italia le malattie cardiovascolari sono causa del 45-50% della mortalità globale; la cardiopatia ischemica da sola è responsabile del 35% dei decessi. L'incidenza annuale di infarto miocardico è di 140.000 casi (ISTAT).

L'infarto del miocardio, ovvero la necrosi del muscolo cardiaco indotta da ischemia (Thygesen et al. 2007), determina una diminuzione irreversibile del numero di cardiomiociti nell'area infartuata. Le aree danneggiate vanno incontro ad una sequenza di modificazioni, che iniziano dalla necrosi ischemica coagulativa e proseguono con l'infiltrazione da parte di cellule infiammatorie, come i neutrofili, i monociti, ed i macrofagi. Il muscolo necrotico viene sostituito da tessuto di granulazione, che, progressivamente, diviene fibroso, per l'aumentata deposizione di collagene di tipo II.

Per lungo tempo il cuore è stato considerato un organo post-mitotico, incapace di rigenerare le proprie cellule (Naqvi et al. 2009). Secondo questo paradigma, ampiamente accettato, ma mai definitivamente dimostrato, il numero di cellule cardiache sarebbe ben definito e costante sin dalla nascita ed il turnover delle proteine contrattili sarebbe sufficiente per assicurarne la funzionalità. L'unica

possibile risposta alla perdita cellulare conseguente ad un insulto sarebbe l'ipertrofia compensatoria delle cellule residue (Pasumarthi e Field, 2002). Di fatto ci sono evidenze che dimostrano una certa capacità rigenerativa del tessuto miocardico (Rumyantsev, 1977; Anversa e Kajstura, 1998; Kajstura et al., 1998). Diversi gruppi di ricerca hanno osservato eventi mitotici nel miocardio adulto, la cui frequenza aumenta drammaticamente in risposta da uno stress (Ring, 1950). L'utilizzo del microscopio confocale ad alta risoluzione, per esempio, ha consentito di identificare cellule in fase di replicazione, nel miocardio di diverse specie di mammiferi, in condizioni fisiologiche, ma soprattutto in condizioni patologiche (Beltrami et al. 2001). Tuttavia l'indice mitotico, sia in condizioni normali che patologiche, è troppo basso per permettere una significativa rigenerazione del miocardio dopo un infarto.

La progressiva perdita di cardiomiociti, associata alla mancanza di un adeguato processo di riparazione endogeno, genera una disfunzione ventricolare sinistra, per la progressiva sostituzione di tessuto funzionale con tessuto cicatriziale, che non ha le proprietà contrattili, meccaniche ed elettriche del normale muscolo cardiaco sano. Il cuore va incontro a modificazioni nella forma, nelle dimensioni e nell'architettura, note come rimodellamento ventricolare post-infartuale, il cui risultato è una perdita della funzione sistolica del ventricolo sinistro con conseguente riduzione della frazione d'eiezione. L'evoluzione naturale è verso lo scompenso cardiaco (Vinge et al. 2008). Nonostante i progressi della terapia farmacologica, la prognosi dello scompenso cardiaco rimane piuttosto sfavorevole. Il trapianto cardiaco è considerato il gold standard per il trattamento dello

scompenso in fase terminale, ma tale opzione è riservata ad una ristretta percentuale di pazienti, per la scarsa disponibilità di donatori d'organo.

L'insufficiente capacità rigenerativa del miocardio, insieme alla carenza di organi disponibili, impone la necessità di esplorare altre possibilità terapeutiche per riparare e/o rigenerare il tessuto miocardico danneggiato. E' in questo contesto che si colloca la medicina rigenerativa, come potenziale alternativa al trapianto cardiaco (Laflamme e Murry, 2005). La ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale applicata alla patologia cardiaca ha compiuto notevoli progressi negli ultimi anni, numerosi studi in vivo ed in vitro ne attestano le notevoli potenzialità terapeutiche. L'ingegneria dei tessuti ("Tissue Engineering", termine coniato dalla fondazione Washington National Science nel meeting del 1987) è stata definita come "una scienza interdisciplinare che applica le metodologie ed i principi propri dell'ingegneria e delle scienze della vita, per realizzare sostituti biologici in grado di ricreare, mantenere o migliorare le funzioni di organi o tessuti danneggiati" (Langer e Vacanti, 1993). La terapia cellulare e le strategie dell'ingegneria dei tessuti promettono di rivoluzionare le terapie attuali per il trattamento di un danno irreversibile al miocardio e migliorare la qualità della vita di milioni di pazienti nel mondo.

L'iniezione di cellule isolate direttamente nel miocardio può essere considerato il primo esempio di ingegnerizzazione del tessuto cardiaco *in situ*.

Il termine "cardiomioplastica cellulare" è stato introdotto per la prima volta da Chiu et al. nel 1995, per descrivere il trapianto di nuove cellule nel contesto del tessuto miocardico danneggiato, allo scopo di rigenerare il muscolo cardiaco e ripristinarne la funzione.

Diversi sono i tipi cellulari finora trapiantati, cardiomiociti fetali (Koh et al., 1993), cellule adulte di origine cardiaca (Li et al., 1999), , fibroblasti dermici (Hutcheson et al., 2000), mioblasti scheletrici autologhi (Menasche et al., 2001) e cellule derivanti dal midollo osseo (Wollert et al., 2004; Lunde et al. 2006). Sebbene gli studi abbiano mostrato miglioramenti della performance cardiaca, questa tecnologia presenta problemi di limitata sopravvivenza, disomogenea distribuzione e scarsa ritenzione delle cellule (Itescu et al. 2003).

Una soluzione a tali difficoltà è rappresentata dal recente impiego di scaffold biodegradabili come supporto alla formazione di tessuto.

La formazione di un tessuto è garantita da un'interazione dinamica tra le cellule che lo costituiscono ed il microambiente circostante, sostanzialmente formato dalla matrice extracellulare e da altri citotipi (fibroblasti, macrofagi, mastociti e plasmacellule), con cui la popolazione cellulare interagisce.

Fino a non molto tempo fa, si ipotizzava che la matrice extracellulare avesse un ruolo inerte, di semplice impalcatura per la stabilizzazione fisica dei tessuti viventi. In realtà è stato dimostrato che, oltre ad avere funzioni di sostegno meccanico, possiede un ruolo attivo nella regolazione del comportamento delle cellule che entrano in contatto con essa, influenzandone sopravvivenza, sviluppo, migrazione, proliferazione, forma e funzione (Alberts et al., 1995).

Fornire alle cellule un supporto durante e dopo il rilascio al sito di interesse ne può promuovere la sopravvivenza, il differenziamento e la costituzione di connessioni funzionali con il tessuto ospite (Davis et al., 2003).

Il ruolo di uno scaffold è quello di agire da vera e propria impalcatura nella costruzione del nuovo tessuto, di conferire un certo grado di protezione agli

elementi cellulari e parallelamente di veicolare in modo mirato, corretto e graduale le cellule nell'area cardiaca danneggiata che si desidera riparare o rigenerare.

Si presuppone che lo scaffold, andando incontro a biodegradazione, formi un tessuto, composto dalle cellule originariamente sedimentate e dalle cellule dell'ospite infiltrate, avente proprietà strutturali o funzionali tali da garantire il ripristino, il mantenimento o il miglioramento della funzione tissutale.

Il "tissue engineering" ha già dato prova della sua funzionalità, in quanto è utilizzato correntemente nella ricostruzioni di porzioni di pelle, cornea, cartilagini ed ossa; inoltre, il reimpianto di cheratinociti, condrociti ed osteoblasti è già largamente usato in chirurgia (Nishida et al., 2004; Brittberg et al., 1994; Kim et al., 2006). Nel caso di organi parenchimatosi e costituiti da più tipi cellulari, come il cuore, le difficoltà sono maggiori per la necessità di trovare il giusto rapporto tra biomateriale e tipo cellulare.

La scelta del biomateriale da utilizzare per la fabbricazione dello scaffold assume, pertanto, un' importanza cruciale.

I biomateriali usati nell'ingegneria tissutale devono possedere le seguenti proprietà:

- 1) biocompatibilità con i tessuti, ossia capacità di determinare una risposta favorevole, senza generare reazioni infiammatorie o immunitarie avverse;
- 2) biodegradabilità in tempi compatibili con l'integrazione dell'impianto e la formazione di nuovo tessuto;
- 3) assenza di tossicità ed immunogenicità;

- 4) proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti da riparare, in modo da poter sopportare le stimolazioni meccaniche tipiche del sito di innesto;
- 5) macrostruttura e morfologia adatte a promuovere l'adesione cellulare e la completa integrazione con l'ambiente circostante;
- 6) microstruttura tridimensionale con un'adeguata porosità, per consentire la migrazione cellulare, l'invasione tessutale e la diffusione gas, metaboliti, nutrienti e segnali molecolari, sia all'interno dello scaffold che tra lo scaffold e l'ambiente circostante.

Differenti biomateriali sono stati testati per riparare il miocardio (Eschenhagen and Zimmerman, 2005; Christman, 2006). **Tabella 1.**

Zimmermann e collaboratori nel 2004 hanno proposto dei criteri guida per la scelta dei supporti da sperimentare nella rigenerazione del tessuto cardiaco danneggiato. Uno scaffold dovrebbe essere stabile da un punto di vista elettrofisiologico, robusto da un punto di vista meccanico per poter essere manipolato ed impiantato, flessibile ed elastico per consentire la contrazione del miocardio, non immunogenico, vascolarizzato o facilmente colonizzabile da vasi dopo impianto.

Attualmente, i biomateriali più appropriati per l'ingegneria del tessuto cardiaco sono scaffold ibridi, costituiti da polimeri naturali (come collagene, fibronectina, fibrina, etc., che hanno spesso il vantaggio di contenere nella loro struttura particolari sequenze di segnale, come RGD Arg-Gly-Asp, che facilitano l'adesione cellulare), combinati con una piccola percentuale di polimeri sintetici (la cui struttura e le cui proprietà meccaniche sono molto più controllabili e prevedibili).

Ad oggi, sono stati sviluppati tre metodi per il riparo del miocardio mediante l'utilizzo di scaffolds biodegradabili (**Figura 1**): l'utilizzo di reti (meshes) polimeriche intorno al cuore come contenimento del ventricolo sinistro per conservarne la geometria e prevenirne l'espansione; l'ingegnerizzazione del tessuto *in vitro*, che consiste nella coltura delle cellule sullo scaffold *in vitro* ed il successivo impianto *in vivo*; infine, l'ingegnerizzazione del tessuto *in situ*, che consiste nell'iniettare direttamente nel miocardio lo scaffold da solo oppure utilizzare il biomateriale come veicolo per il rilascio di cellule o di agenti terapeutici, quali geni o proteine (Christman and Lee,2006).

Sebbene siamo ancora lontani dalla realizzazione di un valido modello che possa essere utilizzato a scopo terapeutico, l'ingegneria del tessuto cardiaco, come reale possibilità di riparare il miocardio danneggiato, è sicuramente una delle più grandi sfide del XXI secolo.

Il presente studio ha come scopo la realizzazione e lo sviluppo di una nuova strategia per riparare e/o rigenerare il tessuto miocardico danneggiato, basata sull'utilizzo dell'ingegneria tissutale in combinazione con la terapia cellulare.

L'ipotesi testata in questo lavoro sperimentale è quella di valutare l'efficacia e la sicurezza di biomateriali a base collagene per il trapianto di cellule cardiache in un modello animale di infarto miocardico.

Differenti prototipi di membrane preformate a base di collagene di tipo I, "cross-linked" con una molecola sintetica 1,4-butanediol diglicidil etere (BDDGE) ed arricchite con fibronectina, sono state seminate con cellule cardiache neonatali di ratto. I tessuti bioingegnerizzati ottenuti sono stati applicati in sede epicardica nell'area infartuata di ratti adulti. La funzione cardiaca è stata valutata mediante

ecocardiografie seriate prima dell'infarto, dopo 4 e 8 settimane. Dopo l'espanto i cuori sono stati utilizzati per le analisi istologiche ed immunoistochimiche.

MATERIALI E METODI

Preparazione delle membrane a base di collagene

Come materiale di partenza per la realizzazione degli scaffold, è stato utilizzato collagene di tipo I in forma di gel estratto dal tendine di Achille equino. La sospensione di collagene è stata preparata attraverso una metodologia messa a punto dalla ditta OPOCRIN SpA3 (Okajima et al., 1993; Hames e Rickwood, 1990; Crambach et al., 1987; Andrews, 1986). Tale processo ne salvaguarda al massimo la struttura e contemporaneamente lo purifica dalla componente polisaccaridica. La parte interna del tendine di Achille di equini, rigorosamente controllati dalle autorità veterinarie, è stata isolata dopo completa rimozione delle membrane sinoviali. I tendini sono stati finemente macinati e sospesi in acqua per poi essere immersi in una soluzione acquosa di HCl a pH 2.5, alla quale sono state aggiunte pepsine (1% p/v rispetto al tessuto), lasciate per tutta la notte. Il trattamento enzimatico a pH acido del tessuto è stato effettuato per rimuovere le regioni telopeptidiche, non-elicoïdali, dalle molecole di collagene in esso presenti. Una volta eseguito il trattamento enzimatico, alla soluzione è stato aggiunto NaOH ed il pH è stato portato al di sopra di 5.5, che corrisponde al punto isoelettrico del collagene (pI), valore soglia a cui le fibre di collagene precipitano. Ripetutamente lavate con acqua distillata, le fibre così ottenute sono state trattate con una soluzione di NaOH 1M per 1 ora, al fine di rimuovere la porzione glicosidica, e monitorate costantemente fino alla completa rimozione dei residui non collagenosi, dei Sali e di altre impurità. Alla fine del processo le fibre di collagene sono state centrifugate, in modo da ottenere un gel omogeneo di colore

bianco-crema. Sono state utilizzate due sospensioni di collagene, che si comportano in maniera differente in funzione del pI. Il primo tipo (indicato come “LF” in **Tabella 2**) precipita al pI come agglomerati di fibre di grosse dimensioni, mentre il secondo tipo (indicato come “SF” in **Tabella 2**) precipita come piccoli aggregati di fibre, e risulta quindi più facile da manipolare.

I campioni preparati sono elencati in Tabella 2.

Le membrane a base di collagene vanno incontro a rapida degradazione *in vivo*. Poiché idrosolubile, inoltre, per essere utilizzato in applicazioni biomediche, il collagene deve essere modificato chimicamente mediante reazioni di “cross-linking”, in modo da ottenere un materiale insolubile in ambiente acquoso a 37°C. Allo scopo di ottenere membrane con una solubilità più bassa ed una maggiore resistenza alla degradazione, abbiamo effettuato il “cross-linking” del gel di collagene con 1 wt% di 1,4-butanediol diglicidil etere (BDDGE – Sigma Aldrich, 95wt% in soluzione acquosa) per 48 ore a 2-4°C. Il gel è stato successivamente lavato per eliminare i residui di BDDGE non coinvolti nella reazione.

Per favorire l’adesione cellulare sulla superficie degli scaffold, prima del processo di essiccamento, al gel di collagene “cross-linked” sono stati aggiunti 50µg di fibronectina, derivante dal plasma umano (0.1 % TBS a pH 7.4, Sigma), per grammo di collagene.

Il gel di collagene è stato steso su una lamina di Mylar (**Figura 2**), in modo da produrre un sottile strato uniforme essiccato all’aria o liofilizzato.

Per essere utilizzati nel nostro modello animale, gli scaffold sono stati preparati in elementi circolari con diametro di 15 mm e sono stati sottoposti a sterilizzazione con γ (25 kGy).

Test Enzimatici

I test di degradazione enzimatica, per valutare la resistenza delle membrane, sono stati effettuati utilizzando l'enzima Collagenasi (derivante dal *Clostridium histolyticum*; Sigma).

E' stata preparata una soluzione di collagenasi contenente 125 CDU/mg (collagen digestion units/mg) in 0.1M TRIS-HCl (pH=7.4) e ne sono stati aggiunti 3.5 ml a 10 mg di ciascuna membrana. La cinetica di degradazione è stata seguita con spettrofotometro UV-VIS (Lambda 35 UV/VIS Spectrometer; Perkin Elmer Instrument, USA) con assorbanza a $\lambda=280\text{nm}$, che corrisponde allo spettro di assorbimento degli amminoacidi aromatici, Tirosina e Triptofano, rilasciati durante la degradazione del collagene. Ogni ora l'assorbimento è stato misurato ed utilizzato per calcolare la percentuale (%) di collagene digerito:

$$\% \text{ di collagene digerito (t)} = A_{280} (t) / A_{280} (\text{final t})$$

Il tasso di digestione del collagene è stato riportato in funzione del tempo in modo da ottenere un profilo di degradazione per ogni campione.

Caratterizzazione meccanica

Le proprietà meccaniche di ogni prototipo sono state valutate in termini di stabilità ed elasticità simulando le condizioni corporee. Le membrane preventivamente immerse in DMEM (Dulbecco's-Modified-Eagle's-Medium) a 37°C per 10 minuti, sono state sottoposte a trazione con una frequenza di 1.6 Hz ed una deformazione di 10% per 100.000 volte. Alla fine di ogni ciclo è stata valutata la percentuale (%) di deformazione residua.

Microscopia Elettronica a Scansione (SEM) e Microscopia Elettronica a Scansione Ambientale (ESEM)

Le ultrastrutture dei differenti scaffold sono state esaminate con un microscopio elettronico a scansione Stereoscan 360 (Leica, Cambridge, UK) ed un microscopio elettronico a scansione ambientale (ESEM-LEO 438VP). Per l'analisi SEM, le membrane sono state preventivamente rivestite con un sottile strato di materiale conduttore, costituito da particelle d'oro.

Isolamento delle cellule neonatali di ratto

Le cellule cardiache neonatali di ratto sono state estratte dai ventricoli di ratti neonati Wistar Han di 1-3 giorni (Charles River Laboratories, Italia). I ventricoli sono stati frammentati e digeriti fino a 10 volte con una soluzione di 180U/mL di collagenasi (Worthington Biochemical Corporation) e pancreatina (Invitrogen) a 37°C, per 6 minuti ogni volta. Durante le fasi della digestione enzimatica, le cellule sono state raccolte in siero di vitello neonato Newborn Calf Serum (Gibco) in ghiaccio, poi lavate e contate.

Semina delle cellule contrattili sulle membrane di collagene

Le cellule cardiache isolate, alla densità di $2 \cdot 10^6$ /ml, sono state seminate su ciascuna membrana, preventivamente tagliata a forma di disco dal diametro di 15 mm, all'interno di piastre da 24 pozzetti, contenenti un mezzo di coltura completo composto da 4:1 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose 4% - Medium 199 con supplemento di 5% siero bovino fetale (FBS), 5% siero equino (HS), 100 U/ μ L di Penicillina, 100 μ g/ μ L di Streptomicina and L-

glutamina all' 1%. Le piastre di controllo sono state preparate seminando $3 \cdot 10^6$ cellule in multiwell da 6 pozzetti con 5 mL di mezzo di coltura. Sia le membrane sedimentate con gli elementi cellulari che le piastre di controllo sono state incubate a 37°C, 5% di CO₂, 100% di umidità. Il mezzo di coltura è stato cambiato il primo giorno dopo la semina e poi a giorni alterni. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Gibco.

Valutazione della contrazione delle membrane

Lo sviluppo della forza contrattile nelle piastre contenenti membrane di collagene seminate con cellule e nelle piastre di controllo, è stato seguito attraverso l'osservazione giornaliera in microscopia ottica utilizzando un microscopio Axiovert 25 (Zeiss). I movimenti di contrazione di cellule e membrane sono stati ripresi nell'insieme mediante una fotocamera digitale Canon Power Shot G5

Modello animale di infarto miocardico

Il modello animale utilizzato in questo studio è quello dell'infarto miocardico creato sul ratto.

Tutti gli animali utilizzati sono stati trattati secondo il regolamento dell' Animal Welfare dell' Università di Napoli "Federico II" e hanno ricevuto cure secondo i principi dell' American Society of Physiology. Tutte le procedure sono eseguite secondo i protocolli della European Convention on Animal Care.

Gli animali sono stati mantenuti in identiche condizioni di temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), umidità ($60 \pm 5\%$) e ciclo luce/buio, e hanno seguito una normale alimentazione.

Ratti maschi adulti Wistar Han (250-300 g; n=25) sono stati anestetizzati

mediante iniezione intramuscolare di ketamina 100 mg/kg e xilazina 5 mg/Kg (Sigma). L'infarto miocardico è stato indotto mediante la legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore (LAD), una metodica affidabile e validata (Ono et al., 1994). L'accesso alla cavità pericardica è stato ottenuto mediante una toracotomia laterale sinistra, realizzata a livello del IV° spazio intercostale sinistro. Il pericardio è stato rimosso e la coronaria discendente anteriore è stata localizzata. Essa appare come un vaso rosso brillante e pulsante, che origina al di sotto dell'auricola sinistra e decorre al centro della parete cardiaca verso l'apice (**Figura 3**). Il vaso è stato legato con un filo da sutura 7-0, 1-2 mm al di sotto della punta dell'auricola sinistra, in modo da indurre un'ischemia del 40-50% della parete ventricolare sinistra. L'occlusione dell'arteria è stata confermata dalla marcata riduzione della contrattilità miocardica e dalla modificazione del colore della parete anteriore del ventricolo sinistro, che è divenuto pallido (**Figura 4**). La toracotomia è stata chiusa con una sutura assorbibile dopo aver aspirato la cavità pericardica.

Una volta indotto l'infarto miocardico gli animali sono stati assegnati in maniera casuale a tre gruppi di studio, tutti sottoposti ad un secondo intervento 4 settimane dopo la legatura della coronaria:

- Gruppo I (MI, n=6): ratti sottoposti a toracotomia ed esposizione del cuore senza alcun impianto.
- Gruppo II (MEM, n=5): ratti sottoposti ad apposizione sulla superficie epicardica di una matrice di collagene di tipo I senza elementi cellulari.

- Gruppo III (MEM+CELLS, n=7): ratti sottoposti ad apposizione sulla superficie epicardica di una matrice di collagene di tipo I precedentemente sedimentata con $2 \cdot 10^6$ cellule.

Tutti gli animali sono stati sacrificati 8 settimane dopo la chirurgia ed i cuori sono stati espianati per eseguire le analisi istologiche e molecolari.

Protocollo di trapianto

Le membrane contrattili sono state applicate a livello epicardico nell'area infartuate del cuore dei ratti sperimentali e sono state fissate utilizzando una colla di fibrina, Tisseel VH fibrina sigillante (Baxter, Deerfield, IL).

In entrambi i gruppi MEM e MEM+CELL, gli scaffold coprivano circa 65% dell'area miocardica infartuata.

Valutazione della funzione cardiaca

Ecocardiografie seriate sono state eseguite, in condizioni basali, cioè prima del trapianto, e dopo 4 e 8 settimane, sui ratti anestetizzati al fine di ottimizzare le immagini cardiache. Le microimmagini ad alta risoluzione sono state acquisite con un'apparecchiatura "Visualsonics VeVo 770®" (ecocardiografo specifico per animali di piccolo taglia) equipaggiato con una sonda da 40 MHz. Il ventricolo sinistro è stato valutato nelle sezioni parasternale asse lungo ed asse corto con un frame rate di 120 Hz. La cinetica regionale è stata valutata secondo le metodiche convenzionali. LVEDD e LVESD sono stati misurati dalla traccia M-mode con una velocità di scansione di 50 mm/s a livello medio-papillare. La Frazione di

Accorciamento (FS) è stata calcolata con la seguente formula: $FS (\%) = [(LVEDD - LVESD)/LVEDD] \times 100$.

Istologia ed immunofluorescenza delle membrane contrattili in vitro e dei cuori espianati

Le membrane di collagene sono state fissate in formaldeide 4%, lavate più volte con PBS e direttamente sottoposte a colorazione.

I cuori espianati sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina e divisi in sezioni di 5 μm di spessore.

Indagini di immunofluorescenza sono state condotte sulle membrane seminate con cellule contrattili.

Per valutare l'avvenuto attecchimento delle cellule di ratto al substrato e la loro distribuzione spaziale, a 10 giorni *in vitro* le membrane sono state marcate con falloidina coniugata con TRITC alla diluizione di 1:100 (Sigma), overnight a 4°C.

Per valutare specificamente i cardiomiociti, a 10 giorni *in vitro* le membrane sono state incubate con un anticorpo primario anti-Troponina I cardiaca (Chemicon International), alla diluizione di 1:100, overnight at 4°C, e successivamente con un anticorpo secondario anti-rabbit IgG coniugato con fluoresceina alla diluizione di 1:500 (Chemicon International), per 2 ore a 37°C. I nuclei sono stati colorati con 4',6'-diamidino-2-fenilindolo DAPI (Sigma).

Le sezioni dei cuori espianati sono state sottoposte a studio istologico standard mediante colorazione con ematossilina-eosina. Inoltre, allo scopo di valutare l'organizzazione delle cellule cardiache all'interno delle membrane di collagene, sono stati eseguiti immunomarcaggi, mediante l'ausilio di anticorpi verso

differenti proteine espresse nei cardiomiociti. Le sezioni sono state incubate con un anticorpo anti- α actinina sarcomerica diluito 1:100 (Sigma), overnight a 4°C, successivamente con un anticorpo anti-mouse IgG coniugato con TRITC diluito 1:40 (Sigma) per 1 ora, a 37°C, quindi con un anticorpo anti-connessina 43 diluito 1:500 (Sigma) overnight a 4°C, ed infine con un anticorpo anti-rabbit IgG coniugato con FITC (Sigma) diluito 1:40, a 37°C, per 1 ora.

La colorazione per i nuclei è stata effettuata immergendo i vetrini in una soluzione di DAPI. Su ogni vetrino è stato aggiunto Vectashield Mounting Medium, ed è stato montato il vetrino coprioggetto.

L'analisi è stata effettuata utilizzando un microscopio a fluorescenza Eclipse TE2000-E invertito (Nikon) ed un microscopio confocale a scansione laser CS SP5 (Leica).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Membrane a base di collagene

La scelta di utilizzare materiali collagenei per il presente studio sperimentale è legata al fatto che tali materiali presentano doti di biocompatibilità superiori a quelle di altri polimeri naturali. Il collagene gioca un ruolo importante nella formazione di organi e tessuti ed è coinvolto in numerose espressioni funzionali delle cellule. Inoltre, il collagene è un materiale biodegradabile, debolmente antigenico e viene riconosciuto dal corpo umano come un costituente naturale piuttosto che una sostanza esterna.

Allo scopo di limitare la cinetica di degradazione del collagene in ambiente fisiologico, sono stati indagati agenti chimici capaci di aumentarne la stabilità chimico-meccanica.

Per controllare il tempo di sopravvivenza degli scaffold a base di collagene, è stato effettuato un processo di reticolazione utilizzando 1,4-butanediol diglicidil etere (BDDGE).

BDDGE è un diepossido simmetrico (*Figura 5a*) capace di reagire, in ambiente acido ($\text{pH} < 6$), con i gruppi carbossilici liberi attraverso l'apertura del suo anello epossidico, ciò porta alla formazione di legami "cross-link" nelle catene del collagene (*Figura 5b*) e di conseguenza alla necessaria stabilizzazione della sua struttura. Il collagene acquisisce una migliore resistenza alla biodegradazione ed una ridotta solubilità.

Il grado di "cross-linking" è stato valutato in termini di permanenza dello scaffold in presenza dell'enzima collagenasi. Il profilo ottenuto (*Figura 6*) sottolinea

l'effetto stabilizzante dovuto al processo di reticolazione: la membrana cross-linkata mostra una completa degradazione in 7 ore rispetto alle 3 ore della membrana non reticolata.

Allo scopo di favorire le interazioni tra le cellule impiantate e la membrana, prima del processo di essiccamento, al gel di collagene è stata aggiunta fibronectina, una proteina naturale estratta del plasma umano, che presenta una sequenza riconosciuta da molti tipi cellulari e pertanto capace di favorire l'adesione delle cellule al substrato.

Il miglioramento dell'adesione delle cellule alla superficie delle membrane è di importanza cruciale per ottenere una struttura realmente contrattile utile per l'impianto finale. Altre importanti caratteristiche che influenzano l'adesione cellulare sono la morfologia della superficie ed il grado di swelling della membrana. Queste caratteristiche possono essere modificate in funzione del processo di essiccamento selezionato, che permette di ottenere strati fibrosi che presentano maggiore o minore spessore, rispettivamente, in modo da fornire diverse condizioni ambientali alle cellule cardiache ospiti.

Le immagini SEM riportate in **Figura 7 a) e b)**, mostrano la tipica morfologia di una membrana essiccata all'aria, che presenta una superficie regolare e grosso modo complanare composta da fibre di collagene di differente diametro, omogeneamente distribuite ed isotropicamente orientate. La rete fibrosa presenta pochi solchi profondi e pori, di 1 - 2 μm , che appaiono piccoli quanto basta ad evitare la penetrazione, e quindi l'intrappolamento, delle cellule nello spessore della membrana. Essa risulta pertanto adatta a fungere da supporto per la lamina di

cellule contrattili, che dovrà essere manipolata chirurgicamente e trapiantata *in vivo*.

In **Figura 7 c) e d)** sono state riportate le tipiche strutture porose di una membrana liofilizzata, caratterizzate da ampi pori di diametro da 150 a 300 μm , omogeneamente distribuiti ed orientati perpendicolarmente alla membrana, come ci si attende quando si formano (durante la liofilizzazione) aghi di ghiaccio che si accrescono nella sospensione di collagene.

Uno screening preliminare per la selezione della tipologia di membrane più adatta è stato effettuato sulla base di valutazioni macroscopiche in termini di maneggevolezza ed elasticità simulando le condizioni corporee. Il miglior risultato ai test di elasticità dopo immersione in DMEM a 37°C per 10 minuti è stato ottenuto dalla membrane n° 8, che alla fine del ciclo è risultata ancora stabile e con un grado di deformazione inferiore al 2% (**Tabella 3**).

Test di interazione tra le cellule cardiache neonatali di ratto e gli scaffold a base di collagene

Nelle piastre di controllo, la semina delle cellule cardiache neonatali di ratto ha dato luogo alla naturale formazione di strati di cellule contrattili 3-5 giorni dopo il piastramento.

Le piastre contenenti i biopolimeri colonizzati da cellule cardiache hanno mostrato risultati variabili. In tutti i campioni è stata osservata sopravvivenza cellulare (test con trypan blue), ma in alcuni casi è stata rilevata una mancata adesione delle cellule ai supporti (principalmente per gli scaffold che non contenevano fibronectina), in altri un' assenza di contrazione a 10 giorni dal piastramento. Gli

scaffold liofilizzati e costituiti da fibre di collagene di grosse dimensioni (“LF” in *Tabella 1*) sono andati incontro ad un eccessivo rigonfiamento, raggiungendo uno spessore (2-4 mm) non adeguato agli scopi sperimentali del nostro studio. Solo gli scaffold fatti da piccole fibre di collagene (“SF” in *Tabella 1*) ed essiccati all’aria hanno mostrato lo spessore (massimo 500-700 µm) e la consistenza adeguati per fungere da supporto al trapianto di cellule nei cuori di ratto. Di questi ultimi solo uno, il n° 8, costituito da collagene di tipo I, “cross-linked” con 1,4-butanediol diglicidil etere (BDDGE), contenente fibronectina (50µg/g di collagene), essiccato all’aria e sotto forma di una membrana sottile, è risultato il substrato ottimale per le cellule cardiache neonatali di ratto, che 5-9 dopo il piastramento hanno formato un sottile strato cellulare capace di contrarsi insieme al supporto.

La membrana di collagene n° 8 è stata modificata per migliorare l’adesione cellulare aumentando il contenuto di fibronectina da 50µg a 75µg/g di collagene. Ciò ha determinato, inoltre, un miglioramento nelle capacità contrattili del campione.

La contrazione è stata misurata al microscopio ottico (*Figura 8*) e le membrane contrattili sono state filmate.

Immunofluorescenza delle membrane in vitro

La presenza di filamenti di actina è stata evidenziata mediante immunofluorescenza per la proteina falloidina, che ha mostrato una distribuzione uniforme e complanare delle cellule cardiache neonatali di ratto nello scaffold a base di collagene (*Figura 9a*). L’immunofluorescenza per la troponina I cardiaca

ha evidenziato la formazione di sarcomeri ben organizzati all'interno dello strato cellulare (*Figura 9b*).

Esperimenti in vivo

Tutte le membrane utilizzate per gli esperimenti in vivo sono state coltivate *in vitro* con cellule cardiache per 9 giorni prima dell'impianto. Abbiamo utilizzato solo le membrane che hanno mostrato una buona capacità contrattile. L'impianto dello scaffold nell'area infartuata è stato effettuato utilizzando una colla di fibrina. Il sistema sigillante utilizzato è costituito da due componenti, che rimangono liquidi per alcuni secondi prima di solidificare in una semirigida matrice gel. Il primo componente consiste in un concentrato di fibrinogeno ed aprotinina, un inibitore della fibrinolisi, mentre il secondo è una miscela di trombina e CaCl₂. Il sigillante viene apposto attraverso l'applicatore Duploject, che mantiene i due componenti in siringhe separate e provvede simultaneamente a miscelarli ed applicarli. Il rapporto fibrinogeno - trombina è 1:1. Questa colla si è mostrata capace di mantenere gli scaffolds nell'area infartuata.

La funzione cardiaca dei tre gruppi di ratti da esperimento è stata valutata mediante l'ecocardiografia, una metodica ampiamente utilizzata per valutare nei modelli animali le modificazioni morfologiche e funzionali indotte da trattamenti farmacologici o da procedure chirurgiche. Si tratta infatti di uno strumento diagnostico estremamente versatile e rapido da utilizzare, che consente una valutazione quantitativa e non invasiva delle dimensioni del cuore, degli spessori parietali, delle strutture valvolari e soprattutto della funzione cardiaca.

I tre differenti gruppi di studio sono stati sottoposti ad ecocardiografie seriate, prima dell'impianto, dopo 4 settimane e dopo 8 settimane. Come atteso, il gruppo I (MI) presentava un deterioramento della funzione del ventricolo sinistro. A 4 e 8 settimane dall'infarto miocardico si osservava una significativa riduzione della percentuale di accorciamento frazionale (FS%) ($p < 0.05$). Al contrario, nel gruppo III (MEM+CELLS) la presenza di membrane contrattili determinava un miglioramento della funzione cardiaca dopo 8 settimane, come mostrato da una conservazione della frazione d'accorciamento FS% ($p < 0.05$). Nessuna differenza significativa nel miglioramento della funzione cardiaca si osservava nel gruppo II (MEM) rispetto al gruppo I (MI), ciò a indicare che la presenza dello scaffold da solo non è in grado di ridurre l'area infartuata né di migliorare la frazione di accorciamento in questo modello sperimentale (**Figura 10**).

L'ecocardiografia ha pertanto dimostrato che l'associazione tra cellule e membrane è stato il più efficace approccio per limitare il rimodellamento cardiaco e la dilatazione ventricolare post-ischemica.

Istologia ed Immunofluorescenza dei cuori espiantati

La colorazione con ematossilina-eosina delle sezioni autoptiche ha evidenziato la permanenza delle membrane a base di collagene nel tessuto 8 settimane dopo l'impianto (freccia in **Figura 11a**) e la penetrazione di vasi sanguigni nello spessore delle membrane (freccia in **Figura 11b**).

Questi risultati acquisiscono una enorme rilevanza alla luce del peso che i fenomeni di angiogenesi e neoangiogenesi hanno in applicazioni di ingegneria tissutale. Per la rigenerazione di tessuti è fondamentale ottenere una rete di vasi

sanguigni *ex novo* o da vasi sanguigni preesistenti (rispettivamente neoangiogenesi ed angiogenesi), che garantisca la normale crescita del tessuto mediante il rifornimento di ossigeno e sostanze nutritive e l'eliminazione dei residui metabolici.

Per approfondire la valutazione dei cardiomiociti impiantati, abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza utilizzando anticorpi diretti contro l' α -actinina sarcomerica e la connessina 43, proteine caratterizzanti il tessuto cardiaco.

L' α -actinina sarcomerica è una proteina che lega l'actina (actin-binding protein) presente nelle cellule muscolari (sia cardiache che scheletriche). È associata alle strie Z che definiscono i sarcomeri. Questa proteina è quindi un buon marcatore cardiaco, in quanto permette di osservare la presenza di un apparato contrattile e la sua organizzazione in sarcomeri all'interno della cellula.

Nel cuore dei mammiferi la connessina 43 è il principale componente delle giunzioni gap. Le gap junctions giocano un ruolo essenziale nel normale funzionamento del sistema cardiaco, mediando la propagazione dell'impulso elettrico e assicurando l'accoppiamento elettrico tra le cellule.

Nella **Figura 12** la marcatura per l' α -actinina mostra la distribuzione dei cardiomiociti e l'integrità delle strutture sarcomeriche delle cellule impiantate. L'immunofluorescenza per la connessina 43 indica la presenza di giunzioni gap, che assicurano la coesione elettrica e meccanica delle cellule e la propagazione dell'impulso elettrico responsabile della loro contrazione sincrona.

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha dimostrato che scaffold a base di collagene di tipo I, “cross-linked” con 1,4-butanediol diglicidil ether (BDDGE), arricchiti con fibronectina (50µg/g di collagene), essiccati all’aria e sotto forma di una membrana sottile, rappresentano un substrato ottimale per le cellule cardiache neonatali di ratto. Queste ultime, da 5 a 9 giorni dopo il piastramento, acquisiscono la capacità di instaurare interazioni stabili con la membrana e contrarsi insieme ad essa. Il composto contrattile ottenuto è risultato facile da maneggiare ed impiantare nell’area infartuata. Negli studi sperimentali condotti *in vivo*, il tessuto ingegnerizzato, prodotto *in vitro*, ha mostrato una buona integrazione con il miocardio e ha determinato un chiaro miglioramento della funzione cardiaca, come hanno rivelato le misurazioni ecocardiografiche condotte prima, dopo e durante l’impianto.

Con questo studio sperimentale abbiamo dimostrato che l’associazione cellule/membrane favorisce il recupero della funzionalità cardiaca a seguito di un insulto ischemico e previene i fenomeni di remodelling post-ischemici.

I nostri risultati suggeriscono che le membrane di collagene possono rappresentare un buon sistema di “delivery” di cellule a livello cardiaco, un supporto per sostenere la neovascolarizzazione nelle aree ischemiche danneggiate e nel complesso quindi un potenziale strumento per la riparazione del danno miocardio irreversibile.

L'ambizioso obiettivo di questa fase sperimentale è quello di poter attuare il passaggio alla sperimentazione clinica sull'uomo ed individuare nuove strategie terapeutiche nell'ambito delle biotecnologie per il riparo del tessuto cardiaco.

BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Watson JD, 1995. "Biologia molecolare della cellula". Terza Edizione Zanichelli.

Andrews AT, 1986. "Electrophoresis: Theory, techniques and biochemical and clinical applications". Clarendon Press, Oxford.

Anversa P and Kajstura J, 1998. "Ventricular Myocytes are not Terminally Differentiated in the Adult Mammalian Heart". *Circ Res* 83:1-14.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan S, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami A, Anversa P, 2001. "Evidence that Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction". *N Engl J Med*; 344:1750-1757.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. 1994. "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte implantation". *N Engl J Med*; 331: 889-895.

Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL, 1995. "Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation". *Ann Thorac Surg*; 60: 12-8.

Christman KL, Lee RJ, 2006. "Biomaterials for the treatment of myocardial infarction". *J Am Coll Cardiol.*; 48:907-913.

Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ, 1987. "Advances in electrophoresis". Weinheim: VHC.

Davis ME, Hsieh PCH, Grodzinsky AJ, Lee RT, 2005. "Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials". *Pharmacol Ther*; 105:151-163.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D et al. 1998. "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system". *J Virol*; 72: 8463–8471.

Eschenhagen T, Zimmermann WH, 2005. "Engineering myocardial tissue". *Circ Res.*; 97:1220–1231.

Fonarow GC, 2008. "Epidemiology and risk stratification in acute heart failure". *Am Heart J.*; 155:200-207.

Hames BH, Rickwood D, 1990. "Gel electrophoresis of proteins. A practical approach". Oxford: IRL Press.

Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA, 2000. "Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts". *Cell Transplant*; 9: 359-68.

Istituto Nazionale di Statistica, www.istat.it.

Itescu S, Schuster MD, Kocher AA, 2003. "New directions in strategies using cell therapy for heart disease". *J Mol Med*; 81:288-296.

Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P, 1998. "Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans". *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95:8801-5.

Kim SS, Sun Park M, Jeon O, et al. 2006. "Poly(lactide-coglycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*. 27: 1399-1409.

Kobayashi H, Shimuzu H, Yamato M, Tono K, Masuda H, Asahara T, Kasanuki H, Okano T, 2008. "Fibroblast sheets co-cultured with endothelial progenitor cells improve cardiac function of infarcted hearts". *Journal of Artificial Organs*; 11:141-147.

Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Field LJ, 1993. "Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium". *Am J Physiol*; 264 (Pt 2): H1727-H1733

Laflamme MA, Murry CE, 2005. "Regenerating the heart". *Nat Biotechnol.*; 23:845–856.

Lee WC, Chavez YE, Baker T, Luce BR, 2004. "Economic burden of heart failure: a summary of recent literature". *Heart Lung*; 33:362-71.

Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM, 1999. "Survival and function of bioengineered cardiac grafts". *Circulation*; 100 (Suppl): II63-II69.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al. and Forfang K, 2006. "Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction". *N Eng J Med*; 335:1199-1209.

Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP, 2001. "Myoblast transplantation for heart failure". *Lancet*; 357:279 –280.

Müller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Doe JS, Long TI, Laird PV, Kloner RA, 2002. "Rebuilding a Damaged Heart: Long-Term Survival of Transplanted Neonatal Rat Cardiomyocytes After Myocardial Infarction and Effect on Cardiac Function". *Circulation*; 105:1720-1726.

Naqvi N, Li M, Yahiro E, Graham R and Husain A, 2009. "Insights into the Characteristics of Mammalian Cardiomyocyte Terminal Differentiation Shown through the Study of Mice with a Dysfunctional c-Kit". *Pediatr Cardiol*; 30:651-658.

Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. 2004. "Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium". *N Engl J Med*; 351: 1187-1196

Okajima T, Tanabe T, Yasuda T, 1993. "Nonurea sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis with high-molarity buffers for the separation of proteins and peptides". *Anal Biochem*; 211:293-300.

Ono S, Bhargava V, Ono S, Mao L, Hagan G, Rockman HA, Ross J Jr, 1994. "In vivo assessment of left ventricular remodeling after myocardial infarction by digital video contrast angiography in the rat". *Cardiovascular Research*; 28:349-57.

Pasumarthi KBS and Field, LJ, 2002. "Cardiomyocyte cell cycle regulation". *Circ Res*; 90:1044-1054.

Ring PA, 1950. "Myocardial Regeneration in experimental Myocardial Lesions of the Heart". *J Pathol Bacteriol*; 62:21-27.

Rumyantsev PP, 1977. "Interrelations of the Proliferation and Differentiation Processes during Cardiac Myogenesis and Regeneration". *Int Rev Cytol*; 51:187-253.

Thygesen K, Alpert JS and White HD, 2007, on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. "Universal definition of myocardial infarction". *European Heart Journal*; 28: 2525-2538

Vinge LE, Raake PW and Koch WJ, 2008. "Gene Therapy in Heart Failure". *Circ Res*; 102:1458-70.

Vacanti JP, Langer R, 1999. "Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation". *Lancet*; 354(Suppl. 1): S132– S134

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H, 2004. "Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial". *Lancet*; 364:141–148.

Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M, Eschenhagen T, 2002. "Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats". *Circulation*; 106:1151–7.

Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T, 2000. "Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes". *Biotechnol Bioeng*; 68:106–114.

Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T, 2004. "Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts". *Biomaterials*; 25:1639–1647

Zamaretti P., Jaconi M. Cardiac Tissue Engineering, 2004. "Regeneration of the Wounded Heart". *Current Opinion in Biotechnology*; 15:430-434.

TABELLE E FIGURE

TABELLA 1: Biomateriali per il trattamento del miocardio infartuato

Biomateriale	Trapianto
<i>Contenimento ventricolo sinistro</i>	
Polipropilene	Da solo
Poliestere	Da solo
<i>Tessuto ingegnerizzato in vitro</i>	
Gelatina	Da solo o con cardiomiociti fetali
Alginato	Con cardiomiociti fetali
Poliglicole/Polilattide	Con fibroblasti dermici
Collagene di tipo I e Matrigel	Con cardiomiociti fetali
PTFE, Acido polilattico, Collagene di tipo I	Da solo o con cellule mesenchimali derivanti dal midollo osseo
Collagene di tipo I	Da solo o con cellule staminali embrionali
Polisopropilamide	Cardiomiociti neonatali o cellule staminali derivanti dal tessuto adiposo
<i>Tessuto ingegnerizzato in situ</i>	
Fibrina	Da solo, con mioblasti scheletrici o cellule mononucleate del midollo osseo
Collagene	Da solo o con cellule del midollo osseo
Alginato	Da solo
Matrigel	Da solo o con cellule staminali embrionali
Collagene di tipo I e Matrigel	Da solo o con cardiomiociti neonatali
Peptidi autoassemblanti	Da solo, con cardiomiociti neonatali o con fattori di crescita derivati dalle piastrine
Gelatina	Con fattori di crescita per i fibroblasti

TABELLA 2: Elenco degli scaffold di collagene testati nello studio

Componente basale	Cross-link	Additivi	Morfologia	Processo di essiccamento	Campione
Collagene di tipo I "LF"	BDDGE	-	Membrana porosa	Liofilizzazione	1
Collagene di tipo I "LF"	BDDGE	-	Membrane compatta	Essiccamento all'aria	2
Collagene di tipo I "LF"	BDDGE	Fibronectina	Membrana porosa	Liofilizzazione	3
Collagene di tipo I "LF"	BDDGE	Fibronectina	Membrane compatta	Essiccamento all'aria	4
Collagene di tipo I "SF"	BDDGE	-	Membrana porosa	Liofilizzazione	5
Collagene di tipo I "SF"	BDDGE	-	Membrane compatta	Essiccamento all'aria	6
Collagene di tipo I "SF"	BDDGE	Fibronectina	Membrana porosa	Liofilizzazione	7
Collagene di tipo I "SF"	BDDGE	Fibronectina	Membrane compatta	Essiccamento all'aria	8
Collagene di tipo I "SF"			Membrane compatta	Essiccamento all'aria	9

Tabella 2: Collagene di tipo I estratto dal tendine di Achille equino; LF: collagene che precipita come grossi agglomerati di fibre al pI (pH 5.5); SF: collagene che precipita come fibre di piccole dimensioni al pI (pH 5.5); BDDGE: agente di "cross-linking" 1,4-butanediol diglicidil etere; fibronectina alla concentrazione di 50 µg/g di collagene.

TABELLA 3: tasso di deformazione degli scaffold

N° campione	Grado di deformazione (%)
1, 3, 5, 7	Non valutabile (swelling eccessivo)
2	Distrutto prima della fine del ciclo
4	Distrutto prima della fine del ciclo
6	2.1 %
8	1.9 %
9	2.5 %

FIGURA 1

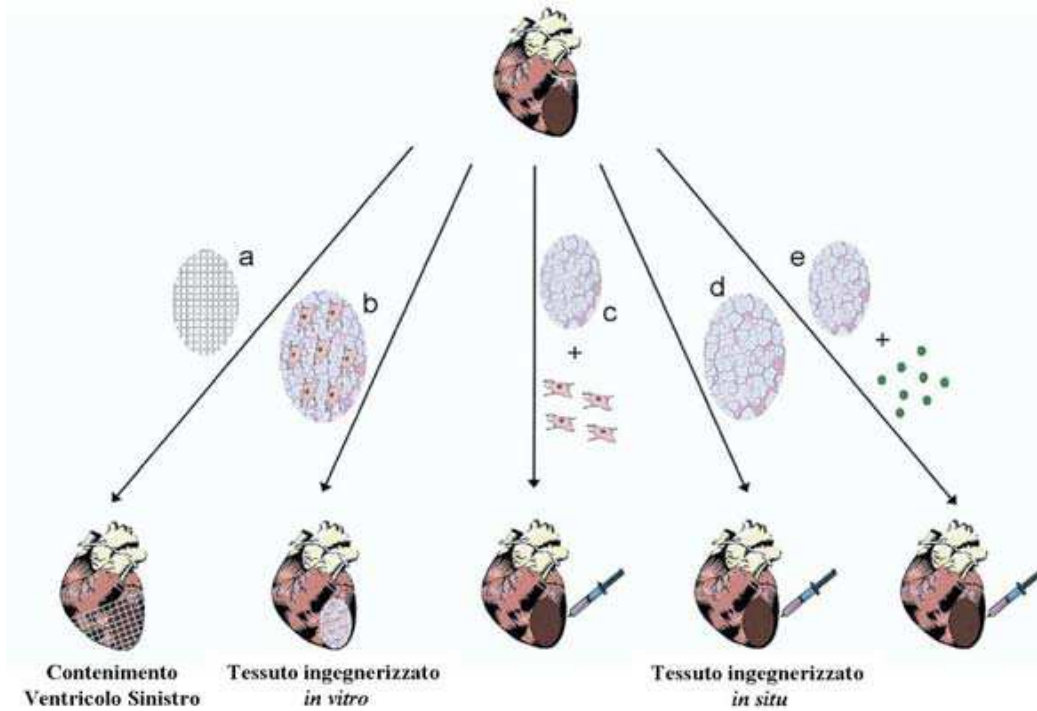


Figura 1: Strategie per il trattamento dell'infarto miocardio mediante l'utilizzo di biomateriali.

a) utilizzo di reti polimeriche intorno al cuore come contenimento del ventricolo sinistro per conservare la sua geometria; b) ingegnerizzazione del tessuto *in vitro*, che consiste nella coltura delle cellule su biomateriale *in vitro* e nel successivo impianto *in vivo*; c), d), e) ingegnerizzazione del tessuto *in situ*, che consiste nell'iniettare il biomateriale da solo (d) oppure nell'utilizzare uno scaffold iniettabile come veicolo per il rilascio di cellule (c) o di agenti terapeutici (e), quali geni o proteine.

FIGURA 2

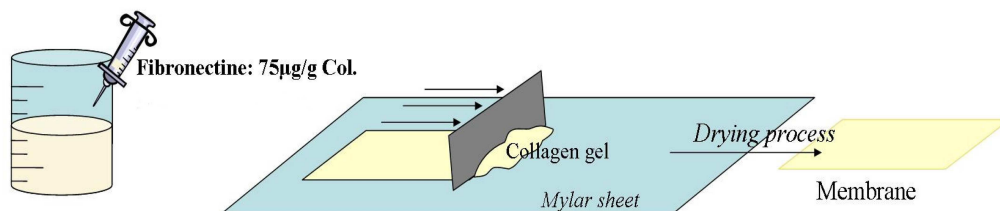


Figura 2. Schema del processo di modellatura del gel di collagene

FIGURA 6

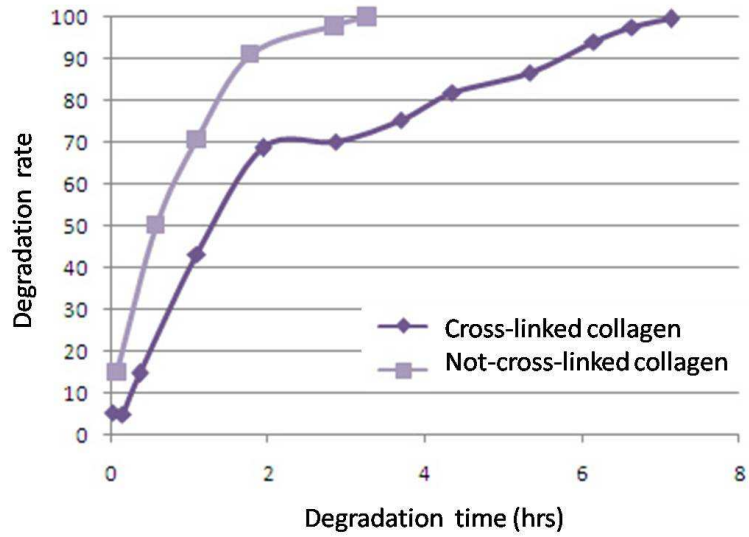


Figura 6. ■ collagene non “cross-linked” (Campione 9); ◆ Collagene “cross-linked” con BDDGE (Campione 6)

FIGURA 7

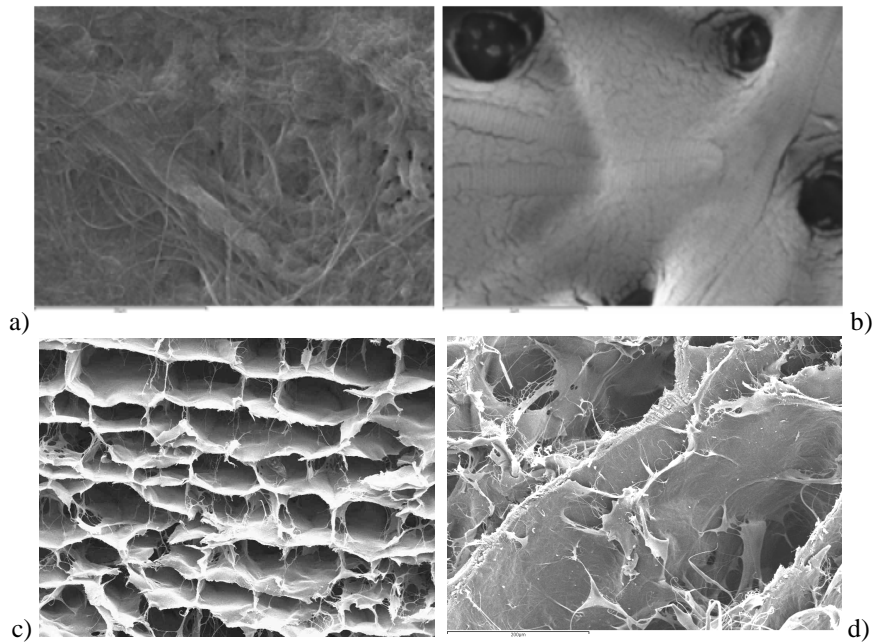


Figura 7. Immagini SEM: a) tipica morfologia di membrana di collagene essiccata all'aria; b) dettaglio di fibre di collagene incorporate nella struttura planare della membrane; c) tipica superficie porosa di membrana di collagene liofilizzata; d) dettaglio di fibre di collagene in un campione liofilizzato.

FIGURA 8

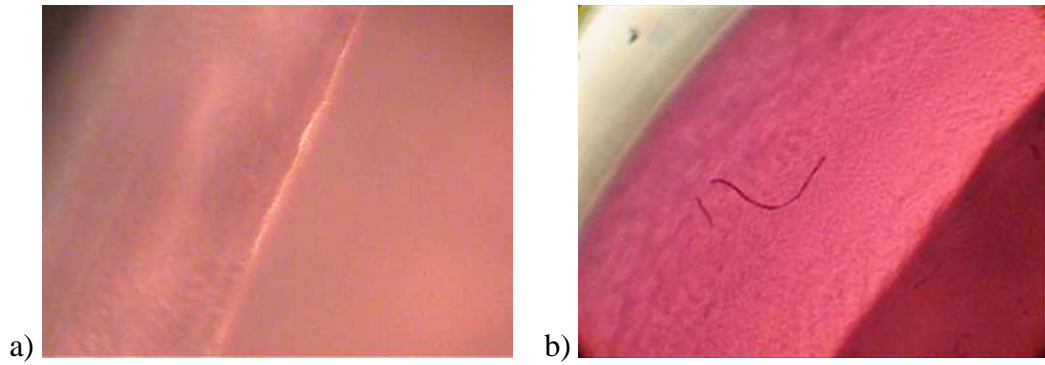


Figura 8. Adesione cellulare e formazione di tessuto contraente su membrane di collagene:
a) 4 giorni dopo il piastramento; b) 8 giorni dopo il piastramento

FIGURA 9

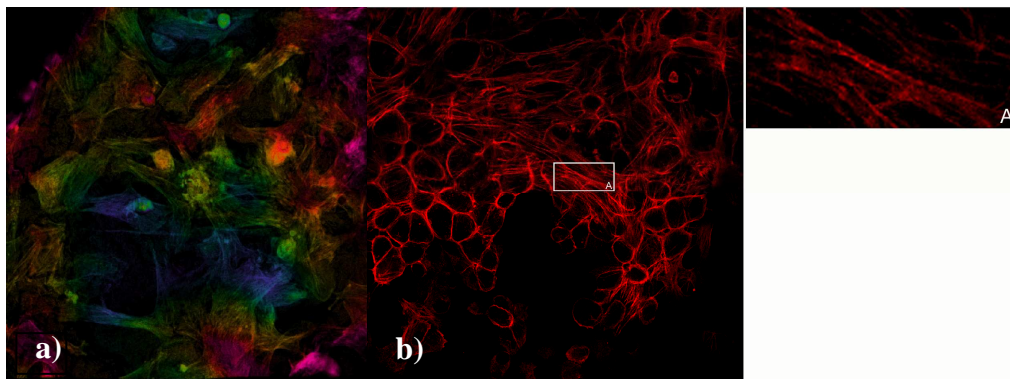


Figure 9. Immagini LSCM delle membrane contrattili: a) immunofluorescenza per falloidina e b) troponina I cardiaca.

FIGURA 10

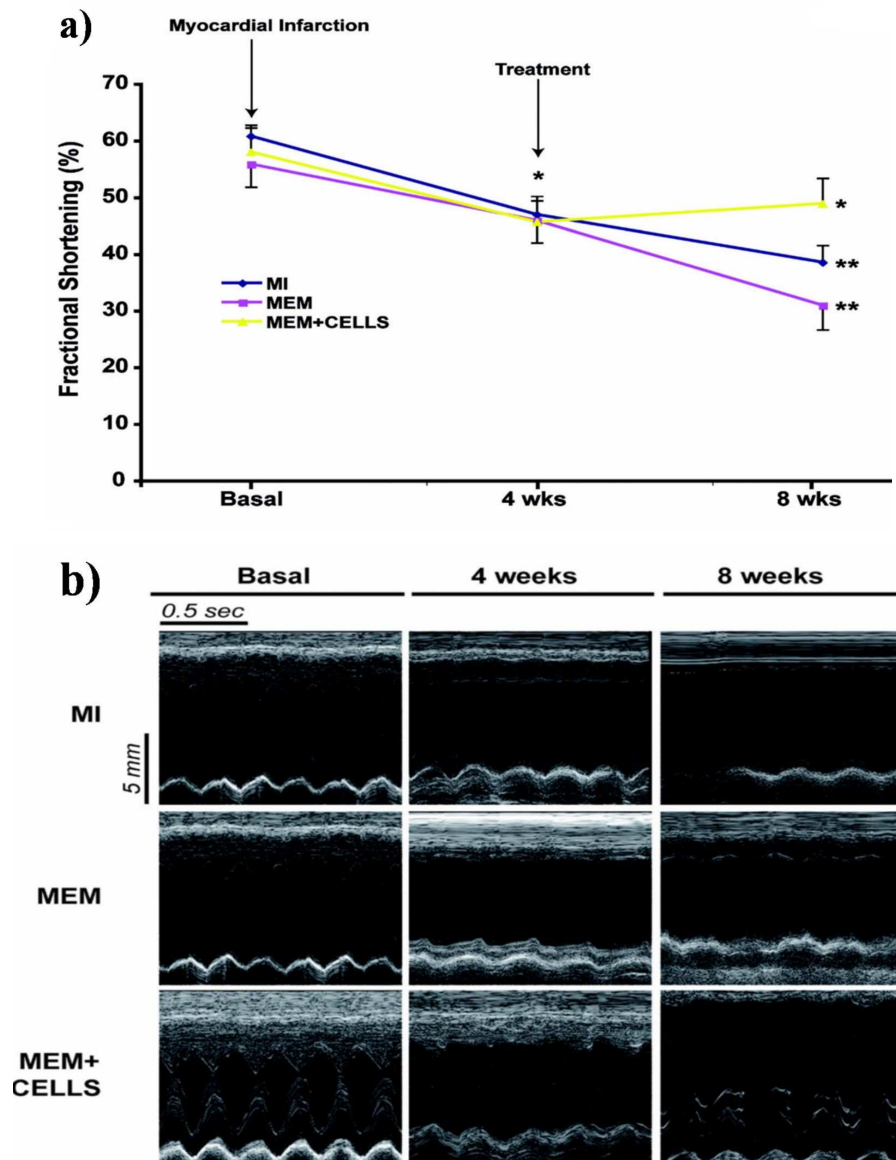


Figura 10. A: Frazione di accorciamento prima dell’impianto e dopo 4 e 8 settimane nei tre gruppi sperimentali: MI, MEM (gruppo di controllo in cui sono state impiantate membrane senza cellule) e MEM + CELLS (gruppo sperimentale in cui sono state impiantate le membrane con cellule contrattili) *p<0.05 vs Basale; **p<0.05 vs Basale e 4 settimane; **B:** Traccia ecocardiografica M-mode nei diversi gruppi sperimentali.

FIGURA 11

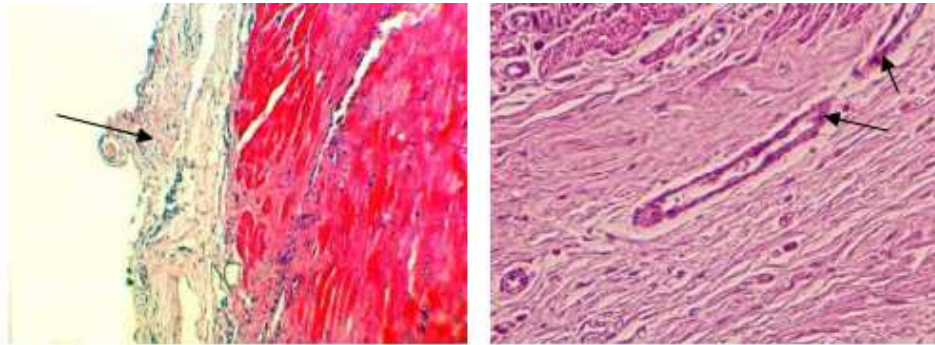


Figura 11. Istologia delle sezioni dei cuori espiantati di ratti a cui sono state impiantate membrane contrattili. a) Le membrane sono ancora presenti sulla superficie cardiaca dopo 8 settimane; b) vasi sanguigni si sono formati nello spessore delle membrane.

FIGURA 12

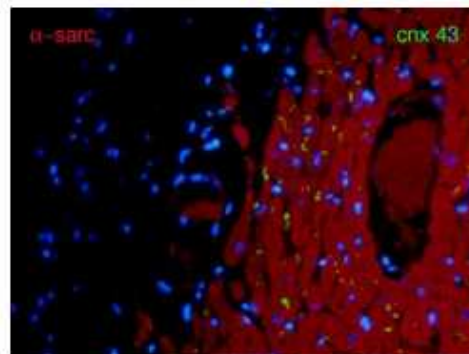


Figure 12. L' immunofluorescenza per α -Actinina Sarcomerica and Connexina 43 mostra la distribuzione dei cardiomiociti e la formazione di giunzioni gap.