

UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA ED ALIMENTAZIONE

## SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE

Indirizzo Sanità Pubblica e Patologia Comparata

### STUDIO DELLA PARTECIPAZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE (hu-MSCs) NEI PROCESSI DI RIPARAZIONE CONSEQUENTI AL DANNO MIOCARDICO ACUTO IN TOPI Balb/c Athymic Nude-Fox1<sup>nu</sup>

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Mauro Dacasto

**Supervisore :**Ch.ma Prof.ssa Valentina Zappulli

**Dottorando :** Andrea Danesi

31 GENNAIO 2013

## RIASSUNTO

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono la prima causa di morte nel mondo e, tra queste, l'infarto miocardico acuto (IMA) ne è la prima causa singola. La ricerca sulla terapia rigenerativa dell'IMA ha evidenziato come le cellule staminali mesenchimali umane da midollo osseo (BM-MSCs) sono le più indicate a tale scopo in quanto presentano una multi-linearità differenziativa, una capacità immunomodulante, un'alta capacità auto-rigenerativa e un alto potenziale proliferativo.

In topi Balb/c Athymic Nude Fox1<sup>nu</sup> sono state trapiantate, a seconda dei gruppi e con diverse tecniche anestesilogiche di intubazione e di posizionamento dei soggetti ai fini del successo chirurgico,  $3 \times 10^6$  BM-MSCs sospese in 45  $\mu$ l di D-MEM prelevate da pazienti sani e caratterizzate per l'espressione dei markers mesenchimali (CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105) e per la negatività dei markers ematopoietici/endoteliali (CD14, CD34 e CD45). Inoltre, sono state effettuate, e confermate, anche prove di differenziazione verso le linee mesenchimali (osteocitaria, condrocitaria e adipocitaria) e di immunomodulazione. Al momento dell'uso, le aliquote sono state trasfettate con GFP tramite la proteina trans-attivatore di trascrizione (TAT) e nuovamente caratterizzate per i marcatori CD73, CD105, HLA ABC, CD40, CD54, CD80, CD86, CD106 e HLA-DR, confermandone la staminalità.

Il miglior successo chirurgico si è avuto con l'animale in posizione supina anche in assenza di intubazione ma con anestesia gassosa via maschera.

L'IMA è stato confermato nel 100% dei casi mentre, nel 13,85% dei campioni (9/65) si sono osservati cluster cellulari atipici con colocalizzazione espressiva di von Willebrand factor e  $\alpha$ -SMA e negatività per c-kit/CD117. L'IF ha evidenziato la presenza di cellule di origine umana in 2 casi a 24h, con una positività all'antigene mitocondriale umano e all' $\alpha$ -

SMA. Inoltre la valutazione dell'espressione di GFP veicolato da TAT nei cuori trapiantati a 24h, 48h e 72h non ha permesso di evidenziare alcuna positività mediante IF.

In conclusione, questo progetto ha permesso di finalizzare una tecnica chirurgica di induzione dell'IMA aumentando il successo post-operatorio permettendo, di conseguenza, una riduzione degli animali utilizzati in accordo con i principi delle 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Inoltre ha definito un'ottimale tecnica di prelievo, coltura ed espansione di BM-MSCs umane e una tecnica di transfezione con la TAT-GFP, che ne ha mantenuto invariato il fenotipo. Gli studi in IHC hanno permesso di valutare il successo del trapianto e la compartecipazione delle BM-MSCs umane in corso di AMI anche se il risultato può essere solo parzialmente confermato in quanto l'IF non ha evidenziato tali cellule nella stessa percentuale. Tale differente sensibilità suggerisce la necessità di un confronto approfondito tra IHC e IF come tecniche da impiegare per la rilevazione delle BM-MSCs GFP+. In ultimo, questo progetto sembra indicare la partecipazione delle BM-MSCs nei processi riparativi conseguenti a danno ischemico anche se non in quantità significativa.

## ABSTRACT

Cardio Vascular Diseases (CVD) are the most common causes of death worldwide and, among these, the acute myocardial infarction (AMI) represents the leading one. Studies comparing the regenerative capacity of distinct stem cells populations suggest that bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) could be the most indicated cells for these purpose. They have a multi-lineage differentiation, an immunomodulatory and self-renewal capacity as well as a high proliferative ratio.

$3 \times 10^6$  BM-MSCs in 45  $\mu$ l of D-MEM have been transplanted in Balb/c Athymic Fox1<sup>nu</sup> mice with different anesthetic e surgical protocols. The BM-MSCs has been characterized for mesenchymal (CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105) and hematopoietic/endotelial (CD14, CD34 e CD45) markers, as well as evaluated for multi-lineage differentiation (osteogenic, chondrogenic and adipogenic) and immunomodulatory property. Before *in vivo* use, the BM-MSCs have been transfected with trans-activator of transcription (TAT)-GFP and characterized again with CD73, CD105, HLA ABC, CD40, CD54, CD80, CD86, CD106 and HLA-DR.

Supine position without intubation has reached the highest surgical successful ratio. AMI has been diagnosticated in 100% of hearts and atypical cells clusters have been observed in 13.85% (9/65) of cases. These atypical cells were positive for von Willebrand factor and  $\alpha$ -SMA and negative for c-kit/CD117. Positive cells for human mitochondrial antigen and  $\alpha$ -SMA has been observed in 2 cases by immunofluorescence technique (IF), whereas no positive cells were detected for GFP.

In conclusion, these study has refined the anesthetic and surgical protocols and increased the successful surgical ratio reducing the use of animals. Moreover, it has ameliorated the isolation and expansion protocols for BM-MSCs as well as transfection TAT-

GFP technique without phenotype changes. BM-MSCs involvement in repair processes post-AMI has been evaluated with immunohistochemistry (IHC) even though the same results have not been reached with IF technique. This different sensibility suggests more investigations between IHC and IF in order to find out the best revealing technical options for BM-MSCs. Lastly, this project seems to confirm the participation of BM-MSCs in the reparative processes after AMI although their number is not adequate.

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

1.1 Le malattie cardiovascolari	7
1.1.1 Infarto miocardico acuto	7
1.1.1.1. Epidemiologia ed eziopatogenesi	7
1.1.1.2 Classificazione	13
1.1.1.3 Aspetti clinici	15
1.1.1.4 Fisiopatologia e aspetti anatomo-patologici	16
1.1.1.5 Diagnosi e terapia	20
1.2 Le cellule staminali	26
1.2.1 Classificazione	27
1.2.2 Uso terapeutico	29
1.2.3 <i>Outcome</i> clinico nell'infarto miocardico acuto trattato con cellule staminali	32
1.2.4 Cellule staminali mesenchimali (MSCs)	35

## 2. SCOPO 39

## 3. MATERIALI E METODI

3.1 Organizzazione del progetto	41
3.2 Modello animale	42
3.3 Modello chirurgico-anestesiologico	46
3.3.1 Trapianto di BM-MSCs TAT-GFP <sup>+</sup> nei cuori post-IMA	51
3.4 Cellule staminali mesenchimali umane da midollo osseo (BM-MSCs)	51
3.4.1 Procedure di prelievo	51
3.4.2 Caratterizzazione delle BM-MSCs	52
3.4.2.1 Immunomodulazione	53

3.4.2.2 Differenziazione verso le linee mesenchimali	54
3.4.3 Fenotipizzazione	55
3.4.3.1 Post-prelievo	55
3.4.3.2 Post-transfezione pre-impianto	55
3.5 Modello di transfezione	57
3.5.1 Green Fluorescent Protein (GFP)	57
3.5.2 Trans-Attivatore di Trascrizione (TAT)	58
3.5.3 Transfezione di BM-MSCs con TAT-GFP+	58
3.6 Studi istopatologici	58
3.6.1 Istologia standard	59
3.6.2 Immunoistochimica (IHC)	59
3.6.3 Immunofluorescenza (IF)	61
3.6.4 Elaborazioni statistiche	62
<b>4. RISULTATI</b>	
4.1 Modello chirurgico-anestesiologico	63
4.2 Isolamento e caratterizzazione delle BM-MSCs	66
4.2.1 Immunomodulazione e differenziamento	67
4.3 Transfezione con TAT-GFP+	69
4.4 Studi istopatologici	72
4.4.1 Istologia standard	73
4.4.2 Immunoistochimica (IHC)	76
4.4.3 Immunofluorescenza (IF)	77
4.5 Analisi statistica	79
<b>5. DISCUSSIONE</b>	81
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	91

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 LE MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Le malattie cardiovascolari (*Cardio Vascular Diseases, CVD*) vengono definite come quella classe di patologie che riguardano il cuore ed i vasi sanguigni (Maton, Anthea, 1993). Sebbene le malattie cardiovascolari si riferiscano al sistema cardiovascolare, spesso tale definizione viene limitata alle patologie aterosclerotiche.

Le CVD rappresentano la più importante causa di morte su scala mondiale. In particolare si osserva che nei Paesi con alto reddito pro-capite, il tasso di mortalità si presenta in declino mentre nei Paesi con reddito pro-capite medio-basso, esso è in rapida ascesa, in modo particolare nel sesso femminile.

### 1.1.1 INFARTO MIOCARDICO ACUTO

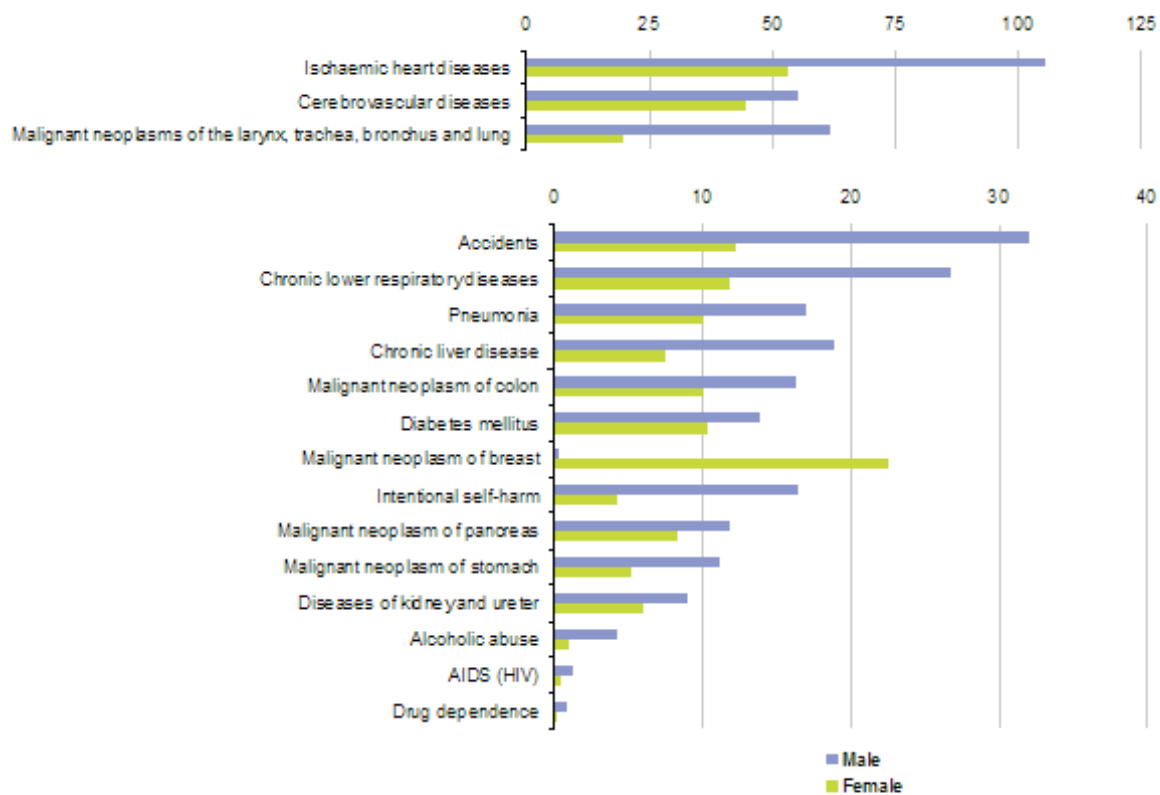
Tra le CVD, l'infarto miocardico acuto (IMA) è una delle patologie più frequenti. L'IMA è causato dall'interruzione del flusso sanguigno in una zona delimitata del cuore che determina la morte cellulare del tratto non vascolarizzato.

#### 1.1.1.1 EPIDEMIOLOGIA ED EZIOPATOGENESI

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono la prima causa di morte in Europa (Figura 1.1) ed hanno causato, nel 2008, oltre 4,3 milioni di morti, ricoprendo il 43% delle cause totali di decesso negli uomini e il 54% nelle donne. Tra le CVD, l'infarto miocardico acuto (IMA) rappresenta, per l'uomo e per la donna, il 20% e il 22% rispettivamente delle cause di morte totali con un drammatico aumento, negli ultimi 5 anni, nelle donne, in modo particolare nei Paesi Europei centro-orientali. Tale incremento nel sesso femminile è



**Figura 1.1.** Cause di morte ogni 100.000 abitanti – tasso di mortalità standardizzato – Dati Eurostat 2010



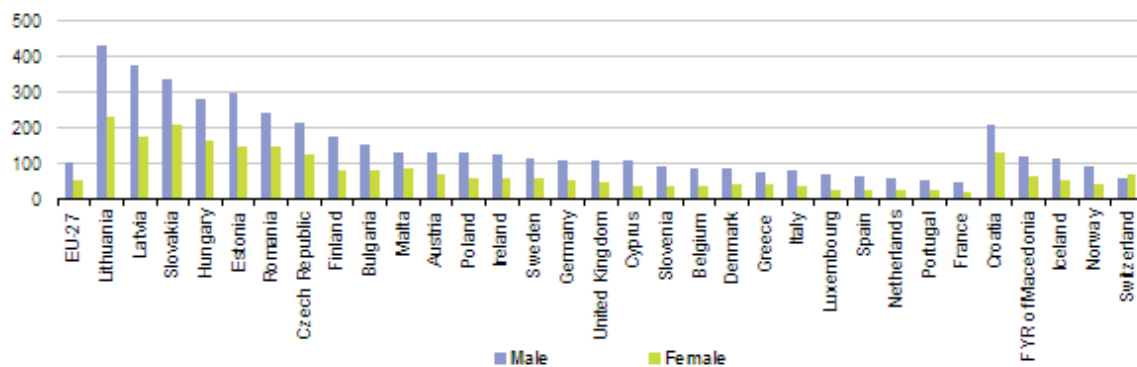
(1) Provisional; the figure is ranked on the average of male and female; note the difference in the scales employed between the two parts of the figure. Source: Eurostat (online data code: hlth\_od\_asdr)

riferibile al notevole aumento, soprattutto nei Paesi dell’Est (Figura 1.2), dell’abuso di alcool e di fumo che, negli ultimi decenni (Allender S. *et al.*, 2008).

Nel 2008, gli Stati Europei hanno speso per la cura delle CVD 192 miliardi di euro, di cui il 57% riferibili alle cure sanitarie, il 22% alle cure post-terapeutiche di riabilitazione e il 21% alla perdita di produttività. Questi dati indicano l’enorme interesse diretto alla ricerca nel campo delle CDV, in particolare rivolto allo studio di terapie innovative per le CDV in genere, e in maniera significativamente specifica all’IMA (Allender S. *et al.*, 2008).

L’eziopatogenesi dell’IMA si presenta molto varia ed è legata, in modo quasi costante, all’aterosclerosi. I fattori di rischio possono essere suddivisi in 1) fattori predisponenti non

**Figura 1.2.** Decessi per malattie ischemiche del cuore ogni 100.000 abitanti – Tasso di mortalità standardizzato – Dati Eurostat 2009



(1) EU-27, Denmark and Ireland, provisional; Denmark, France, Italy, Romania and Iceland, 2009; Belgium, 2008; the figure is ranked on the average of male and female.  
Source: Eurostat (online data code: tps00119)

influenzabili, 2) fattori di rischio di primo ordine, 3) fattori di rischio di secondo ordine e 4) altre cause. Non sono da escludere inoltre, i fattori scatenanti.

### 1. Fattori predisponenti non influenzabili:

- a. predisposizione familiare alle malattie cardiache ischemiche (Myers R.H. *et al.*, 1990; Bertuzzi M. *et al.*, 2003);
- b. età: gli uomini acquisiscono un fattore di rischio indipendente all'età di 45 anni mentre le donne a 55. Un ulteriore fattore di rischio indipendente è la parentela di 1° grado con familiari che abbiano subito eventi coronarici con un'età  $\leq$  di 55 anni, per la parentela maschile (padre – fratello), e  $\leq$  a 65 per la parentela femminile (sorella e/o madre);
- c.  sesso: quello maschile è un fattore predisponente (Wilson P.W. *et al.*, 1998).

## 2. Fattori di rischio di primo ordine:

- a. dislipidemia e ipertrigliceridemia: in particolar modo un aumento del colesterolo totale e LDL (*Low Density Lipoprotein*) e una diminuzione dell'HDL (*High Density Lipoprotein*) (Bhalli M.A., 2011);
- b. ipertensione arteriosa sistemica: l'angiotensina II, spesso elevata in pazienti con l'ipertensione, contribuisce all'aterogenesi stimolando la crescita delle cellule muscolari lisce (Chobanian A.V. *et al.*, 1996) e disattivando la fosfolipasi C che può condurre all'aumento della concentrazione di calcio intra-cellulare, all'aumento della sintesi di proteine e all'ipertrofia delle cellule muscolari lisce (Gibbons G.H. *et al.*, 1992). Può anche aumentare l'attività della lipo-ossigenasi delle cellule muscolari lisce incrementando l'infiammazione e l'ossidazione delle LDL. L'ipertensione presenta anche un effetto pro-infiammatorio, aumentando la formazione di perossido di idrogeno e radicali liberi nel plasma (Lacy F. *et al.*, 1998). Queste sostanze riducono la formazione di ossido nitrico da parte dell'endotelio, incrementano le resistenze periferiche e aumentano l'adesione leucocitaria (Vanhoutte P.M. & Boulanger C.M., 1995);
- c. diabete mellito: con o senza insulino-resistenza (Mitchell R.S. *et al.*, 2007);
- d. sindrome metabolica o sindrome X o sindrome di Reaven: definita come la manifestazione simultanea di insulino-resistenza, iperinsulinemia, stati pre-diabetici o diabete mellito di tipo 2 conclamato, dislipidemia, obesità centrale, iperuricemia e ipertensione arteriosa. Viene considerata una condizione clinica che precede lo sviluppo di complicanze vascolari a cui è associata un'aumentata incidenza di cardiopatia ischemica, disfunzioni del ventricolo sinistro e scompenso cardiaco (Mente A., 2010);

- e. bulimia, obesità: considerata come un valore di Indice di Massa Corporea (IMC)  $> 30$  calcolato come  $P \text{ (Kg)} / h \text{ (m)}^2$  (Yusuf S. *et al.*, 2005);
- f. tabagismo (Ambrose J.A. & Barua R.S., 2004; Teo K.K. *et al.*, 2006).

### 3. Fattori di rischio di secondo ordine:

- a. aumento della lipoproteina Lp(a);
- b. iperfibrinogenemia: con valori maggiori di 300 mg/dl;
- c. iperomocisteinemia  $< 12$  mmoli/l: causata da insufficiente apporto di Vitamine B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e acido folico o da deficit genetico degli enzimi adibiti al metabolismo dell'omocisteina come la cistationina beta-sintetasi e la metilene-tetra-idro-folato reduttasi (Nehler M.R. *et al.*, 1997);
- d. sindrome degli anticorpi anti-fosfolipidici (APS): malattia autoimmune che causa trombosi venose ed arteriose oltre che sintomi neurologici e cardiaci (Sharma A.K., 2011);
- e. sedentarietà (Knoops K.T. *et al.*, 2004);
- f. fattori psico-sociali: stress negativo, stato sociale inferiore, inquinamento atmosferico (Peters A. *et al.*, 2004) e consumo prolungato e continuativo di alcool (Williams M.J. *et al.*, 1998; Murphy J.C., 2008).

### 4. Altre cause:

- a. morte improvvisa negli atleti: decesso dovuto ad arresto cardiaco improvviso che colpisce giovani atleti (età media  $< 45$  anni) di sesso prevalentemente maschile (95%) che non presentano anomalie di ordine elettro- e/o ecocardiografico. (Limongelli G. *et al.*, 2007; Marijon E., 2011);

- b. angina pectoris variante: dovuta ad improvvisi spasmi delle pareti arteriose coronariche, si presenta come una elevazione transitoria del segmento ST in fase di dolore toracico acuto che segue i ritmi circadiani con picco tra la mezzanotte e la mattina presto (Kusama Y., 2011);
- c. Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS): malattia cronica caratterizzata da ricorrenti episodi di collasso delle vie aeree superiori parziale o completo e da ostruzione durante il sonno, associata con intermittenti desaturazioni di ossigeno, frammentazione del sonno, da russamento violento e da stanchezza diurna (Fava C., 2011).

#### **Fattori scatenanti:**

1. sforzi violenti, stress con grandi variazioni della pressione arteriosa;
2. angina instabile (rischio di infarto del 20%): condizione clinica caratterizzata da una moltitudine di sintomi molto simili all'infarto da cui si distingue per assenza di alterazioni dei marcatori sierologici (Segen J.C., 2006);
3. ritmi circadiani: il 40% di tutti gli infarti avvengono al mattino tra le 6 e le 12, probabilmente in seguito al picco cortisonico (vedasi paragrafo 1.1.1.4).

Come osservabile dal precedente elenco, la maggior parte dei fattori di rischio sono correggibili da parte della persona e questo indica che molti infarti miocardici acuti potrebbero essere prevenuti mantenendo uno stile di vita volto all'eliminazione, per quanto possibile, di tutti i fattori modificabili (punti 2 e 3).

Nella città di Copenaghen, nel 1989, è stato condotto uno studio in cui è emerso che i fattori socio-economici come una educazione scolastica breve, un reddito insufficiente

(particolarmente nelle donne) e una convivenza da non-sposati, sono fattori correlati ad una aumentata incidenza di infarto miocardico acuto (Nyboe J. *et al.*, 1989).

Altri fattori che possono aumentare il rischio di IMA sono l'uso di farmaci contraccettivi (Khader Y.S. *et al.*, 2003), l'infiammazione come importante step nella formazione di placche aterosclerotiche (Wilson A.M. *et al.*, 2006), le periodontiti (Scannapieco F.A. *et al.*, 2003) e i depositi di calcio nelle arterie coronarie (Detrano R. *et al.*, 2008).

#### 1.1.1.2 CLASSIFICAZIONE

Esso può essere classificato in base 1) alla causa, 2) alla zona colpita e 3) ai rilievi elettrocardiografici (ECG).

##### **1. In base alla causa:**

- a. Tipo 1: infarto miocardico spontaneo correlato all'ischemia dovuta ad un evento coronarico primario come rottura e/o erosione e/o fissurazione e/o dissezione di placche aterosclerotiche;
- b. Tipo 2: infarto miocardico secondario all'ischemia dovuta ad una aumentata domanda o ad un ridotto apporto di ossigeno come, per esempio, spasmi dell'arteria coronaria, anemia, aritmia, embolismo, ecc.;
- c. Tipo 3: morte improvvisa del miocardio, compreso l'arresto cardiaco, con sintomi suggestivi di ischemia miocardica accompagnata da elevazione del tratto ST o evidenze di un trombo neoformato attraverso l'angiografia e/o la necropsia. Normalmente, per la sua natura acuta e improvvisa, non si hanno alterazioni dei marcatori di laboratorio;
- d. Tipo 4: associato con angioplastica coronarica o stents. Esso si suddivide in:

- i. Tipo 4a: infarto miocardico associato ad intervento coronarico percutaneo (*Percutaneous Coronary Intervention - PCI*);
- ii. Tipo 4b: infarto miocardico associato a trombosi da stent, come confermato da angiografia e/o autopsia;
- e. Tipo 5: infarto miocardico associato a bypass coronarico (*Coronary Artery Bypass Graft - CABG*) (Thygesen K. *et al.*, 2007).

## **2. in base alla zona colpita**

- a. transmurale: coinvolge tutto lo spessore della parete ed è dovuto all'occlusione di una arteria coronaria maggiore. Esso può essere ulteriormente suddiviso in anteriore, posteriore ed inferiore;
- b. sub-endocardico: coinvolge una porzione sub-endocardica della parete ventricolare sinistra, del setto interventricolare o dei muscoli papillari ed è dovuto ad una interruzione o restringimento di piccole arterie coronarie locali. (Reznik A.G. *et al.*, 2010).

## **3. in base ai rilievi elettrocardiografici (ECG):**

- a. infarto con elevazione del tratto ST (*ST Elevation Myocardial Infarction - STEMI*);
- b. infarto senza elevazione del tratto ST (*No ST Elevation Myocardial Infarction - NSTEMI*)(Moe K.T. *et al.*, 2010).

### 1.1.1.3 ASPETTI CLINICI

L'insorgenza dei sintomi dell'IMA è, normalmente, graduale e progressiva nell'arco di molti minuti e raramente è istantanea (National Heart, Lung and Blood Institute, 2006). Il dolore più comune è il dolore toracico, spesso descritto come “una pinza che stringe” o “una pietra che opprime”, che si irradia molto spesso al braccio sinistro. Tuttavia esistono molte variazioni, anche se meno frequenti: ad esempio, l'irraggiamento può essere verso l'alto (dolore al collo, ai denti o addirittura alla testa), a entrambe le braccia, al braccio destro o alla bocca dello stomaco; il dolore può essere epigastrico, soprattutto nell'infarto posteriore e molti pazienti riferiscono il dolore come accompagnato da sensazione di morte imminente. Il segno di Levine, in cui il paziente si stringe il pugno sullo sterno, è stato classificato come predittivo di un dolore toracico di origine cardiaca anche se uno studio prospettivo-osservazionale ha dimostrato la poca validità di tale segno (Marcus G.M. *et al.*, 2007).

Altri sintomi possono essere dispnea, causata da una riduzione dell'output del ventricolo sinistro dovuta al danno miocardico, diaforesi, debolezza, nausea, vomito e palpitazioni. Essi sono dovuti alla massiccia secrezione di catecolamine da parte del sistema nervoso simpatico in risposta al dolore e alle anomalie emodinamiche (Little R.A. *et al.*, 1986). Inoltre la perdita di coscienza, dovuto ad un deficit di afflusso sanguigno a livello cerebrale, e l'arresto cardiaco, dovuto ad alterazioni elettriche che portano a fibrillazione ventricolare, possono essere altre conseguenze di un infarto miocardico acuto.

Tipicamente i sintomi appena descritti sono intensi, prolungati, non influenzati dal riposo o dai derivati nitrati anche se vi sono però infarti che si presentano in modo attenuato. I sintomi tipici dell' infarto miocardico acuto sono presenti nell'80-85% dei casi, in quanto il 15-20% degli infarti è asintomatico, soprattutto nei diabetici e negli anziani. Le donne e i pazienti anziani riportano sintomi atipici più frequentemente dei maschi o dei



giovani (Canto J.G. *et al.*, 2007): i sintomi più frequenti nella donna sono la fatica, la dispnea, il dolore del collo e il dolore al braccio destro (McSweeney J.C. *et al.*, 2003) mentre il dolore toracico presenta un valore predittivo significativamente inferiore che nell'uomo (Coventry L.L., 2011). Il 15-20% degli infarti miocardici sono silenti e questi casi vengono normalmente individuati casualmente ad un esame elettrocardiografico.

#### 1.1.1.4 FISIOPATOLOGIA E RILIEVI ANATOMO-PATOLOGICI

Le variazioni che intervengono in conseguenza di una ischemia cardiaca sono molteplici e complessi. L'ischemia miocardica si realizza per la concorrenza di due elementi:

1. un ridotto apporto di ossigeno al miocardio;
2. un'insufficiente rimozione delle scorie metaboliche in conseguenza di una ridotta perfusione ematica di un settore più o meno grande del cuore.

Il solo deficit di ossigeno (ipossia/anossia) in presenza di una normale clearance dei prodotti del metabolismo tissutale locale, come ad esempio nell'anemia grave, nelle malattie cardiache cianotizzanti, nell'asfissia e/o nell'avvelenamento da monossido di carbonio, non si accompagna, normalmente, a sintomi ischemici. Il meccanismo fisiopatologico fondamentale è uno squilibrio tra richiesta e apporto di ossigeno o per un'eccessiva richiesta da parte del miocardio o per una marcata riduzione/cessazione dell'apporto o per entrambe le condizioni. (Nienaber C., 1983).

In presenza di ostruzione coronarica, gli sforzi fisici, la tachicardia o fatti emozionali aumentano la richiesta di ossigeno da parte del miocardio e possono determinare uno squilibrio transitorio tra richiesta ed apporto ("ischemia da domanda") che è alla base della gran parte degli episodi di angina stabile. Se lo squilibrio è causato invece da una riduzione acuta dell'apporto di ossigeno per un aumentato tono vascolare coronarico (vasospasmo

coronarico) o una marcata riduzione del flusso coronarico per la presenza di aggregati piastrinici o trombi, il deficit primario è nell'apporto di ossigeno ("ischemia da apporto") che è responsabile della sindrome coronarica acuta (angina instabile, infarto del miocardio e morte improvvisa). In molti casi al determinismo dell'ischemia concorrono sia un'aumentata richiesta che una riduzione dell'apporto di ossigeno.

Circa l'85% degli infarti miocardici sono provocati da eventi trombotici dovuti a rottura o fissurazione di placche aterosclerotiche con occlusione totale dell'arteria coronaria di competenza (De Wood M.A., 1987; Davies M.J., 1990) e la formazione di tali placche è un evento che avviene lentamente, nel corso di decenni (Woollard K.J. & Geissmann F., 2010). Le placche coronariche che sono prone alla rottura, si presentano normalmente piccole e non ostruttive, con un rivestimento ricco di lipidi ricoperto da una sottile capsula fibromuscolare. L'attivazione di macrofagi e linfociti T presenti a livello della placca e secernenti metalloproteasi e citochine, provoca l'erosione e l'assottigliamento della capsula stessa che, associate alle forze emodinamiche del normale flusso sanguigno, possono portare alla rottura della placca (Thompson S.G. *et al*, 1995). Tale rottura porta all'esposizione del collagene sub-endoteliale che attiva sia l'adesione e l'aggregazione piastrinica che tutta la cascata coagulativa con la formazione del trombo. In particolare questi eventi portano a:

1. il rilascio di sostanze come il trombossano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), il fibrinogeno, la 5-idrossitriptamina (5-HT), i fattori attivanti le piastrine, che promuovono ulteriormente l'aggregazione piastrinica;
2. l'attivazione della cascata coagulativa con la formazione di fibrina e la stabilizzazione del trombo occlusivo;
3. un deficit locale di fattori anti-trombotici come la trombomodulina e le prostacicline.

Inoltre la contemporanea assenza di fattori antispastici endotelio-derivati può portare ad un vasospasmo locale che peggiora ulteriormente l'occlusione coronarica già presente.

Come precedentemente accennato, tali eventi seguono un ritmo circadiano in rapporto alle catecolamine con picco nelle ore mattutine. I picchi dei livelli di catecolamine nelle prime ore dopo il risveglio, sono associati al massimo effetto di aggregazione piastrinica, di tono vascolare, di frequenza cardiaca e di pressione arteriosa: tutti questi fisiologici cambiamenti possono coadiuvare una situazione precaria, portando alla rottura di una placca aterosclerotica. Sia le regioni colpite dall'evento ischemico che quelle non affette vanno incontro, nelle ore, nei giorni e nei mesi successivi la trombosi dell'arteria coronaria, a cambiamenti progressivi.

L'ischemia provoca una immediata ipocinesia e la necrosi inizia a svilupparsi nelle zone sub-endocardiche, più sensibili a causa del minor afflusso sanguigno fisiologico, già dopo 15-30 minuti dall'evento trombotico. Entro la prima ora dall'evento ischemico si osserva l'insorgenza di una deplezione di glicogeno (visibile utilizzando per i preparati la colorazione PAS - *Periodic acid-Schiff*) e di un iniziale edema cellulare. Ai bordi dell'area ischemica possono osservarsi le "wavy fibers", fibre non contrattili non vitali stirate dalle fibre contrattili vicine. Nell'arco delle prime ore si osserva l'iniziale infiltrazione di neutrofili con progressiva necrosi coagulativa delle fibre ed emorragia. Successivamente è possibile osservare una progressiva necrosi dei miocardiociti che divengono ipereosinofili con perdita dei nuclei. Inoltre, ai bordi dell'infarto o di una zona di riperfusione, si rinvengono la presenza di bande di contrazione eosinofile caratterizzate da bande trasverse ipereosinofile di precipitati miofibrillari nei miociti morti. Nelle successive 3-6 ore la necrosi si estende nelle zone epicardiche colpendo tutto lo spessore della parte ventricolare: contemporaneamente, nelle zone non colpite, si osserva un aumento della contrattilità, condizione definita ipercinesia. Dopo circa 4-12 ore dell'inizio della morte

cellulare, si osserva la progressione della necrosi coagulativa caratterizzata da rigonfiamento cellulare, rottura degli organelli citoplasmatici e denaturazione delle proteine. Nell'arco dei primi giorni le lesioni sono progressive con avanzamento della necrosi coagulativa, della striatura delle fibre con perdita dei nuclei e aumento dell'infiltrazione neutrofilica. Dopo 3-7 giorni appare ai bordi dell'area infartuata il tessuto di granulazione consistente in macrofagi, fibroblasti e nuovi capillari: in questo momento il tessuto colpito si presenta particolarmente "morbido" con aumento drammatico dell'insorgenza di rottura ventricolare, evenienza che capita nel 6% dei casi circa nell'uomo (Oliva P.B. *et al.*, 1993), in quasi il 30% nei topi maschi e il 10% nelle femmine, sottoposti a legatura dell'arteria coronaria anteriore di sinistra (Cavasin M.A. *et al.*, 2004). Inoltre si osserva l'iniziale disintegrazione delle fibre miocardiche morte con necrosi dei neutrofili e infiltrazione macrofagica con rimozione del materiale necrotico. A 7-10 giorni si osserva la progressione della fagocitosi delle cellule necrotiche e la progressiva deposizione di tessuto di granulazione, con partenza dai bordi dell'area ischemica. A 10-34 giorni il tessuto di granulazione è più abbondante con presenza di collagene di tipo I (Bishop J.E. *et al.*, 1990) e nelle settimane successive, il tessuto di granulazione migra verso il centro della zona colpita mentre il tessuto necrotico viene fagocitato dai macrofagi. Il tessuto di granulazione matura con aumento del tessuto connettivo e perdita dei capillari: dopo circa 2-3 mesi, la zona colpita risulta essere completamente cicatrizzata lasciando un tessuto più sottile, non elastico, non contrattile e non conducente impulsi. Tali cambiamenti nella struttura portano ad ulteriori modificazioni anatomiche, come la dilatazione delle camere, che prendono il nome di rimodellamento ventricolare. Questo rimodellamento può condurre ad insufficienza cardiaca congestizia, aritmia ventricolare e/o rottura della parete (Pappas P.J. *et al.*, 1991).

I cambiamenti istopatologici sono riassunti nella Tabella 1.1 (Kumar V., 2007).

### 1.1.1.5 DIAGNOSI E TERAPIA

La diagnosi di infarto, o il suo sospetto diagnostico, può essere enunciata dall'integrazione dell'anamnesi del paziente con l'esame obiettivo generale e il rilievo di determinati segni provenienti dagli esami diagnostici (Mallinson T., 2010).

Nel 1979 la World Health Organization (WHO) ha formulato dei criteri in base ai quali è probabile (2 positività su 3) o certa (3 su 3) la diagnosi di infarto miocardico acuto. Tali criteri sono:

1. anamnesi di dolore ischemico del torace con durata superiore ai 20 minuti;
2. cambiamenti in ECG seriali;
3. aumento/caduta dei marcatori sierici come creatinin-kinasi (CK)-MB e la troponina cardiaca.

Nel 2000, la WHO ha rivisto tali criteri dando maggior prominenza ai marcatori sierici (Alpert J.S. *et al.*, 2000).

### **Anamnesi**

Essa può essere molto variabile da persona a persona. I pazienti, nel 20% dei casi, possono anche non riferire nessun tipo di dolore o altro sintomo anche se nella maggior parte dei casi si riscontra in anamnesi un dolore tipicamente localizzato alla regione retrosternale con irradiazione tipica verso la spalla e l'arto superiore sinistro, benché sia possibile l'irradiazione cervicale o alla scapola sinistra. Nel caso di infarto miocardico di tipo inferiore (o "diaframmatico") il dolore insorge in regione epigastrica e può essere confuso con un dolore addominale di origine non cardiaca. L'intensità del dolore è in

**Tabella 1.1.** Progressione temporale dei cambiamenti anatomico-patologici dell'infarto miocardico acuto nell'uomo (Kumar V., 2007)

<b>Tempo</b>	<b>Esame macroscopico</b>	<b>Esame microscopico</b>
0 - 0.5 ore	nessun cambiamento	<ul style="list-style-type: none"> <li>nessun cambiamento</li> </ul>
0.5 - 4 ore	nessun cambiamento	<ul style="list-style-type: none"> <li>deplezione del glicogeno (colorazione PAS)</li> <li>possibile presenza ai bordi di "wavy fibers"</li> </ul>
4 - 12 ore	a volte aree più scure	<ul style="list-style-type: none"> <li>iniziale necrosi coagulativa</li> <li>edema</li> <li>emorragia</li> </ul>
12 - 24 ore	aree scure	<ul style="list-style-type: none"> <li>progressione necrosi coagulativa</li> <li>cariopicnosi</li> <li>ipereosinofilia dei miocardiociti</li> <li>bande di contrazioni eosinofiliche</li> <li>iniziale infiltrazione neutrofilica</li> </ul>
1 - 3 giorni	il centro dell'infarto diventa giallo	<ul style="list-style-type: none"> <li>progressione necrosi coagulativa</li> <li>perdita dei nuclei e striatura</li> <li>aumento dell'infiltrato neutrofilico</li> </ul>
3 - 7 giorni	iperemia ai bordi perdita di consistenza del centro infartuale giallo	<ul style="list-style-type: none"> <li>iniziale disintegrazione delle fibre morte</li> <li>necrosi dei neutrofili</li> <li>iniziale rimozione macrofagica</li> </ul>
7 - 10 giorni	margini rosso mattone	<ul style="list-style-type: none"> <li>incremento della fagocitosi</li> <li>iniziale formazione di tessuto di granulazione ai bordi</li> </ul>
10 - 34 giorni	margini rosso-grigio con depressione dell'area	<ul style="list-style-type: none"> <li>tessuto di granulazione con collagene di tipo I</li> </ul>
2 - 8 settimane	tessuto di granulazione bianco - grigiastro	<ul style="list-style-type: none"> <li>aumento del tessuto collagene</li> <li>diminuzione della cellularità</li> </ul>
oltre 2 mesi	cicatizzazione completa	<ul style="list-style-type: none"> <li>formazione di tessuto collagene denso</li> </ul>

genere molto forte, di tipo costrittivo o a volte di tipo trafittivo, sovente accompagnato da una sudorazione fredda, ad un senso imminente di morte, ad una profonda astenia e, più di rado, a nausea e vomito. Differentemente dall'angina stabile, il dolore provocato dall'infarto miocardico dura più di 30 minuti e non è alleviato né dal riposo, né dall'assunzione di farmaci come l'isosorbide dinitrato o la trinitrina.

### **Esame Obiettivo Generale**

Alla visita clinica spesso si rileva una ipertensione e una tachicardia in caso di infarto anteriore e/o laterale e, al contrario, una ipotensione e una bradicardia in caso di infarto posteriore. All'esame auscultatorio, si possono rilevare una diminuzione del I tono con, saltuariamente, uno sdoppiamento del II. Inoltre è possibile rilevare un soffio sistolico con ritmi di galoppo per la comparsa del III e/o IV tono (Harrison, 2006).

### **Elettrocardiogramma**

Nell'arco delle prime 24h post-infarto, l'esame elettrocardiografico (ECG) può risultare completamente senza segni dell'evento ischemico in atto mentre, trascorso tale periodo e ad esclusione di alcune eccezioni, esso può fornire utili indicazioni sulla sede, l'estensione e la durata dell'infarto. Come precedentemente detto, esistono infarti che non provocano alterazioni riscontrabili dall'ECG, i cosiddetti *No ST Elevation Myocardial Infarction* (NSTEMI). Per contro, gli STEMI (*ST Elevation Myocardial Infarction*) provocano alterazioni classificabili in base al timing dell'esecuzione dell'ECG e precisamente:

- stadio acuto: breve elevazione dell'onda T, sopraslivellamento del tratto ST dovuto alla lesione, onda di Pardee;
- stadio intermedio: obliquazione e normalizzazione del segmento ST, scomparsa dell'onda R che viene sostituita da un complesso QS o un'onda Q (di ampiezza > 1/4

dell'onda R e durata > 0,04 sec.) dovuta a necrosi e negativizzazione dell'onda T dovuta all'ischemia. Per la precisione l'ischemia è presente anche nello stadio acuto ma la negativizzazione dell'onda T è nascosta dal sopraslivellamento del tratto ST. Nello stadio intermedio invece la lesione si riduce, il segmento ST si normalizza e l'onda T negativizzata appare visibile;

- Stadio cronico: progressiva normalizzazione dell'onda T e una piccola R può riapparire. L'onda Q si mantiene stabile, nella maggioranza dei casi, per tutta la vita. Un'elevazione del tratto ST che perduri oltre 6 mesi può indicare lo sviluppo di un aneurisma ventricolare.

Nell'infarto non Q (NQMI) non è presente l'onda Q, pur riscontrandosi le alterazioni del tratto ST e dell'onda T: in questo caso la necrosi non è transmurale, non coinvolge cioè l'intero spessore ventricolare dall'endocardio al pericardio. Se l'onda Q invece è presente (QwMI, dove "w" sta per wave) la necrosi sarà transmurale.

### **Esami di laboratorio**

Recentemente l'utilizzo dei marcatori sierici è una procedura particolarmente efficace nel contribuire alla diagnosi d'infarto. In breve, i marcatori più utilizzati inseriti nelle ultime linee guide (Wright R.S. *et al.*, 2011) sono:

- troponina cardiaca I e T (cTnI e cTnT): marcatori estremamente sensibili alla necrosi miocardica e, di conseguenza, alla diagnosi di IMA poiché il valore plasmatico nei soggetti normali è pressoché uguale a zero. Pertanto il loro dosaggio consente di identificare pazienti con piccolissimi, a volte microscopici, fenomeni di necrosi miocardica che, altrimenti, non avrebbero soddisfatto i criteri enzimatici



convenzionali per la definizione di IMA. La troponina, in corso di infarto del miocardio, inizia ad aumentare dopo circa 3-4 ore dall'inizio dei sintomi e si mantiene persistentemente elevata per circa due settimane;

- mioglobina: marcatore non specifico, in quanto presenta sia una origine cardiaca che muscolare, è comunque uno dei più precoci e viene quindi utilizzato quando si sospetta una insorgenza dell'ischemia entro le 6 ore dalla presentazione del paziente. La sua normalizzazione avviene entro le 24h;
- creatinin-kinasi isoforma MB (CK-MB): marcatore relativamente specifico in quanto prodotto da un danno muscolare generico. L'innalzamento si presenta in 10-24 ore con una curva di normalizzazione in 2-3 giorni e può dare indicazioni dell'estensione dell'ischemia se i suoi valori si mantengono elevati oltre tale limite;
- lattato deidrogenasi (LDH): marcatore moderatamente specifico in quanto consente di valutare un aumento della trasformazione di piruvato in lattato indicando una carenza di ossigeno nel metabolismo muscolare. Presenta un picco in 72 ore con una normalizzazione nell'arco di 10-14 giorni.

Esistono molti altri test diagnostici che non possono essere presi in considerazione in questa sede: si rimanda alla bibliografia presente (Lee-Lewandrowski E. *et al.*, 2011).

La terapia dell'infarto miocardico acuto è dipendente dal tempo trascorso dall'inizio dell'ischemia, ma in linea di principio generale si può affermare che tutte le procedure sono rivolte nella stabilizzazione clinica del paziente e nel perfondere al più presto possibile la zona ischemizzata.

Brevemente, i farmaci e le procedure che vengono utilizzate sono:

- ossigeno gassoso: per ridurre l'ischemia da necrosi e alleviare il dolore da necrosi miocardica;
- antidolorifici: il più utilizzato è la morfina in quanto riduce l'efferenza simpatica dovute alle catecolamine circolanti e può ridurre l'insorgenza di aritmie contrastando le conseguenze degli effetti elettrofisiologici indotti dall'iperattività simpatica. Inoltre determina dilatazione dei vasi venosi di capacità diminuendo il precarico del VD e del VS, riduce il postcarico del VS per dilatazione arteriolare, diminuisce il lavoro del VS, diminuisce il fabbisogno di O<sub>2</sub> del miocardio ischemico, risolve il dolore da ischemia miocardica e riduce l'ansia del paziente;
- acido acetilsalicilico: presenta un rapido effetto antitrombotico o antifattore X attivato che ostacola la formazione di trombina prevenendo la formazione del trombo. Inoltre inibisce con effetto immediato e totale la ciclo-ossigenasi piastrinica e la produzione piastrinica di trombano A<sub>2</sub>, che è un potente proaggregante piastrinico;
- nitroglicerina: fornisce ossido nitrico esogeno che si aggiunge a quello endogeno derivante dalla conversione metabolica dei nitrati organici a livello della membrana cellulare delle cellule muscolari lisce di venule ed arteriole e, come la morfina, dilata i vasi venosi diminuendo il precarico del VD e del VS, riducendo il postcarico del VS per dilatazione arteriolare, diminuendo il lavoro del VS e il fabbisogno di O<sub>2</sub> del miocardio ischemico. Inoltre, dilatando i vasi coronarici epicardici, aumenta il flusso del circolo collaterale coronarico al miocardio ischemico aumentando l'apporto di O<sub>2</sub> e riducendo l'area ischemica e le dimensioni dell'IMA;
- trombolisi sistemica: può essere diretta o indiretta, ha la funzione di attivazione enzimatica catalizzando la trasformazione del plasminogeno in plasmina che ha un

potente effetto fibrinolitico. Grazie a tale proprietà la plasmina è in grado di dissolvere il trombo coronarico ristabilendo la pervietà coronarica;

- eparina: forma un complesso con l'antitrombina III, inibisce il fattore X attivato e la trombina attivata bloccando l'accrescimento del trombo e prevenendo la re-trombosi occludente dopo trombolisi. A lungo termine vengono normalmente prescritti anticoagulanti orali;
- $\beta$ -bloccanti: riducono la frequenza cardiaca, la contrattilità miocardica e la pressione arteriosa;
- ACE-inibitori: interferiscono con il rimodellamento del VS e ne attenuano la dilatazione nel tempo riducendo a lungo termine l'incidenza di scompenso cardiaco congestizio;
- angioplastica coronarica transluminale percutanea (PTCA): intervento chirurgico che consente di ristabilire la pervietà della coronaria responsabile dell' IMA;
- bypass aorto-coronarico (Coronary artery bypass surgery o CABG): intervento chirurgico che rivascolarizza la coronaria responsabile dell'IMA a valle dell'ostruzione.

## 1.2 LE CELLULE STAMINALI

In passato si è sempre creduto che i miocardiociti non avessero la capacità di rigenerarsi e che quindi il numero di tali cellule presenti nel cuore alla nascita dettassero il destino di tale organo nel corso della durata della vita. (Linzbach A. J. *et al.*, 1960). Basandosi su questo paradigma, i cardiomiociti avrebbero la possibilità di andare incontro ad ipertrofia ma non potrebbero venirne generati di *ex novo* dal rientro nel ciclo cellulare di cellule miocardiche non differenziate (Anversa P. *et al.*, 2006). Nel corso degli anni questo dogma è stato smentito da diversi studi che hanno dimostrato l'esistenza e la

partecipazione di cellule staminali cardiache residenti (CSCs) nei processi rigenerativi post-ischemici (Beltrami A.P. *et al.*, 2003; Leri A. *et al.*, 2005).

### 1.2.1. CLASSIFICAZIONE

Le cellule staminali possono essere definite come cellule in grado di dividersi generando, nel caso di una divisione asimmetrica, due cellule figlie, la prima in grado di differenziarsi transitoriamente e la seconda indifferenziata e con le caratteristiche della cellule madre mantenendosi indifferenziata (auto-rinnovamento o *self-renew*), oppure, nel caso di una divisione simmetrica, a due cellule figlie indifferenziate (Beckmann J. *et al.*, 2007).

La classificazione delle cellule staminali si basa su diversi criteri inerenti 1) al loro tessuto di origine e 2) al loro potenziale differenziativo.

Brevemente, le cellule staminali possono classificarsi in:

#### 1) Tessuto di origine

- a. cellule staminali embrionali (ESC): derivano dalla morula o dal tessuto epiblastico della massa cellulare interna (embrioblasto) della blastocisti e possono essere toti- o multipotenti;
- b. cellule staminali fetali (FSC): derivano dai tessuti fetali e generalmente sono multipotenti anche se possono trovarsi delle FSC pluripotenti (Bongso A. & Lee E.H., 2005);
- c. cellule staminali amniotiche (AFSC): derivano dal liquido amniotico e vengono considerate multipotenti potendosi differenziare in cellule osteogeniche, miogeniche, adipogeniche, endoteliali, epatiche e della linea neuronale (De Coppi P. *et al.*, 2007);

d. cellule staminali adulte (SSC): chiamate anche cellule staminali somatiche, si ritrovano nei tessuti del bambino e dell'adulto e sono generalmente multi- e unipotenti (Jiang Y. *et al.*, 2002). Vengono considerate adulte anche le cellule del cordone ombelicale dove è possibile riscontrare la presenza di cellule staminali pluri- e multipotenti (Ratajczak M.Z. *et al.*, 2007). Altre fonti di cellule staminali adulte pluripotenti possono essere il midollo osseo, il cervello, il fegato, l'epidermide, i muscoli scheletrici, il tratto gastrointestinale, il pancreas, gli occhi, il sangue e la polpa dentale (Hipp J., 2008).

## 2) Potenziale differenziativo

- a. totipotenti: sono cellule che sono in grado di dare origine ad un organismo intero e completo, tessuti extra-embryonali compresi. La possibilità di dare origine ad un organismo *in toto* permane, nell'uomo, per tre divisioni cellulari, ovvero finché l'embrione non raggiunge lo stadio di otto cellule, a partire dal quale i singoli blastomeri riducono il proprio potenziale differenziativo. Negli stadi embrionali successivi, morula e blastocisti, le cellule sono molto plastiche e mantengono la capacità di formare vari sottotipi cellulari (Mitalipov S. & Wolf D., 2009);
- b. pluripotenti: sono cellule che derivano dall'epiblasto dell'embrioblasto della blastocisti e sono in grado di generare tutti i compartimenti cellulari dell'organismo adulto provenienti dai 3 foglietti germinativi ma non all'organismo *in toto* (Ulloa-Montoya F. *et al.*, 2005);
- c. multipotenti: sono cellule capaci di generare, differenziandosi, le cellule dello specifico compartimento in cui risiedono come, ad esempio, le cellule staminali emopoietiche che possono dare origine a qualsiasi elemento

cellulare presente nel sangue (Weissman I.L. *et al.*, 2001). Come già precedentemente descritto, esse sono presenti in quasi tutti i tessuti adulti (Hipp J., 2008);

- d. oligopotenti: sono cellule in grado di differenziarsi in pochi tipi cellulari della stessa famiglia, come ad esempio le cellule staminali linfoidi o mieloidi;
- e. unipotenti: sono cellule che producono un solo tipo cellulare, come ad esempio le cellule staminali muscolari, ma che si differenziano dalle cellule differenziate solo per la loro capacità di auto-rinnovamento (*self-renew*).

### **1.2.2 USO TERAPEUTICO**

Considerata la potenzialità rigenerativa delle cellule staminali, i ricercatori hanno focalizzato la loro attenzione sugli studi inerenti la loro possibilità di utilizzo terapeutico. I tre maggiori approcci che si stanno sviluppando per raggiungere tali scopi sono:

1. trapianto di cellule staminali o loro derivati cellulari;
2. costruzione di tessuti biologici *in vitro* per impianto diretto con cellule staminali o loro derivati cellulari;
3. induzione o miglioramento della proliferazione e differenziamento *in vivo* delle cellule staminali residenti per la rigenerazione del tessuto lesa.

Non potendo trattare in questa sede in modo completo ed esauriente l'immensa letteratura presente riguardante l'uso terapeutico delle cellule staminali per la terapia delle cardiomiopatie di origine ischemica e non, tratteremo schematicamente le principali fonti di cellule staminali utilizzate in ambito clinico, le vie di somministrazione e il meccanismo di miglioramento della funzionalità cardiaca: per ulteriori approfondimenti si rimanda alla

consultazione delle reviews in bibliografia (Murry C.E. *et al.*, 2005; Laflamme M.A. & Murry C.E., 2005; Seegers V.F.M. & Lee R.T., 2008).

Le principali fonti di cellule staminali adulte utilizzate sia in ambito sperimentale che clinico per la rigenerazione di miocardiociti *ex novo* sono:

- mioblasti scheletrici: cellule staminali residenti nei muscoli, presentano un'integrazione elettromeccanica molto bassa con i miocardiociti anche se forniscono un substrato putativo aritmogenico (Fernandes S. *et al.*, 2006);
- cellule staminali da midollo osseo (BMC):
  - *cellule staminali mononucleate*: includono diverse sottopopolazioni con caratteristiche morfologiche e fenotipiche diverse (Villaron E.M. *et al.*, 2004) ed hanno dimostrato di transdifferenziare in miociti e promuovere la neovascolarizzazione (Schatteman G.C. *et al.* 2004);
  - *cellule progenitrici endoteliali*: sottopopolazione delle cellule midollari, hanno dimostrato di promuovere la vasculogenesi e, di conseguenza, l'ossigenazione del tessuto ischemico dopo il danno (Young P.P. *et al.*, 2007);
  - *cellule staminali mesenchimali (MSC)*: rara sottopopolazione di cellule midollari, particolarmente studiate nell'ambito della terapia dell'infarto miocardico acuto e verranno trattate in modo più approfondito nel paragrafo 1.2.4;
- cellule staminali mesenchimali da tessuto adiposo (AT-MSC): cellule recentemente scoperte, presentano una morfologia e un fenotipo molto simile a quello delle cellule mesenchimali da midollo osseo (Kern S. *et al.*, 2006). Esse hanno attirato l'attenzione dei ricercatori e dei clinici soprattutto per la possibilità di estrarre enormi volumi di

tessuto adiposo e di cellule evitando la coltura in laboratorio e senza rischio per il paziente o limitazioni di ordine etico (Fraser J.K. *et al.* 2006);

- cellule staminali cardiache residenti (CSC): cellule staminali residenti nel tessuto cardiaco presenti in nicchie e in grado di differenziarsi in cardiomiociti o cellule della linea vascolare (Torella D. *et al.*, 2006). Il loro isolamento e la loro espansione per l'utilizzo in ambito clinico come alternativa all'uso di cellule staminali derivanti dal midollo osseo, è sicuramente argomento interessante anche se discutibile in quanto le BMC presentano, oltre alle stesse proprietà delle CSC, anche una pluripotenzialità che tali cellule, invece, non possiedono (Méndez-Ferrer S. *et al.*, 2006);
- cellule staminali embrionali (ESC): cellule staminali toti- o multipotenti che derivano dallo zigote (totipotenti) o dalle cellule della massa cellulare interna (multipotenti). Esse presentano tutte le caratteristiche elettromeccaniche e fisiologiche ideali per la riparazione miocardica, come una illimitata capacità di differenziazione in tutte le linee cardiache (Caspi O. & Gepstein L., 2004). Tuttavia presentano forti limiti etici (Salter B. & Salter C., 2012) e biologici, in quanto mostrano una elevata immunogenicità (Robertson N.J. *et al.*, 2007) e una alta incidenza nella formazione di teratomi (Hwang W.S. *et al.*, 2006);
- cellule staminali derivanti dalla linea germinale (SSC): sono cellule staminali spermatogoniali che, come recentemente dimostrato, possono dare origine, *in vitro*, a tutte le cellule dei tre foglietti germinativi, inclusi i miocardiociti, acquisendo quindi le caratteristiche delle cellule staminali embrionali (Zovoilis A. *et al.*, 2008). Concettualmente le SSC derivanti da biopsia testicolare potrebbero essere utilizzate nella terapia staminale senza le limitazioni etiche e immunologiche proprie delle ESC (Guan K. *et al.*, 2006).



Le vie di inoculo delle cellule staminali primariamente utilizzate sono:

- intracoronarica: iniezione diretta nelle arterie coronarie di cellule staminali (Assmus B. *et al.*, 2006);
- intravenosa: iniezione in vene periferiche di cellule staminali;
- intramiocardica: iniezione di cellule staminali direttamente nel tessuto miocardico (Williams A.R. *et al.*, 2011 – Otto Beitnes J. *et al.*, 2012);
- endomiocardica: iniezione diretta nell'endocardio di cellule staminali (Konstantinos E. *et al.*, 2010);
- epicardica: trapianto di cellule staminali sull'epicardio attraverso l'uso di foglietti cellulari creati in laboratorio (Hamdi H. *et al.*, 2011);
- intramiocardica transvenosa: iniezione di cellule staminali nella vena intraventricolare anteriore effettuata in venografia via sinus coronarico (George J.C. *et al.*, 2008).

La via di inoculo delle cellule staminali permane argomento di acceso dibattito in quanto ognuna di esse presenta vantaggi e svantaggi che non permettono l'elezione della via migliore (Perin E.C. & Lopez J. 2011).

### **1.2.3 OUTCOME CLINICO DELL'INFARTO MIOCARDICO ACUTO TRATTATO CON CELLULE STAMINALI**

L'obiettivo primario nella terapia dell'AMI è quello di ripristinare una adeguata vascolarizzazione della zona ischemica e le cellule staminali, pur con risultati diversi, sembrano essere adatte per questo compito.

Numerosi studi hanno valutato l'*outcome* clinico dei pazienti sottoposti a terapia rigenerativa attraverso l'uso diretto di cellule staminali: un elenco dei più recenti studi è

riassunto in Tabella 1.2 (Ricardo Sanz-Ruiz R *et al.*, 2010; George J.C. 2010). La maggior parte di essi utilizza la via intracoronarica per l'inoculo delle cellule staminali ed i risultati sono discordi l'uno dall'altro. Uno dei primi trial clinici, condotto da Strauer e collaboratori in 10 pazienti non randomizzati, ha riportato una diminuzione della zona infartuata ed un aumento della perfusione a dispetto di nessun miglioramento della frazione di eiezione del ventricolo sinistro (LVEF) a 3 mesi dal trapianto in comparazione con il gruppo di controllo (Strauer B.E. *et al.*, 2002). Il primo trial clinico randomizzato è stato il TOPCARE-AMI che, sebbene abbia dimostrato un incremento della LVEF a 4 mesi e una riduzione dell'area infartuata a 12 mesi, non presentava dei gruppi di controllo di confronto (Assmus B. *et al.*, 2002). Nel trial BOOST, il trapianto ha portato sia ad un aumento della contrattilità nella zona infartuata che un aumento della LVEF del 6%. Tale miglioramento però è stato mantenuto a medio termine (18 mesi) solo dai pazienti che presentavano un'area infartuata maggiore (Wollert K.C. *et al.*, 2004). Nel trial REPAIR-AMI l'incremento della LVEF è stato del 2,8% a 12 mesi (Schächinger V. *et al.*, 2006), mentre nel trial FINCELL è stato del 5% (Huikuri H.V. *et al.*, 2008). In ultimo, nel trial REGENT si sono osservati dei miglioramenti del 3% circa rispetto al gruppo di controllo, ma questo ultimo studio è stato sospeso in quanto a 6 mesi tale differenza non era più significativa e il follow up dei pazienti risultava incompleto (Tendera M. *et al.*, 2009).

Altri studi clinici, invece, non hanno riscontrato miglioramenti funzionali. Nei trials HEBE e ASTAMI non si sono riscontrati, dopo iniezione di cellule staminali, effetti significativi su LVEF, sulla superficie dell'area infartuata e sul volume del ventricolo sinistro (Lunde K. *et al.*, 2006; van der Laan A. *et al.*, 2008; Hirsh A. *et al.*, 2011), mentre Janssens e collaboratori, pur confermando il non miglioramento nella LVEF, hanno invece riscontrato una riduzione della superficie dell'area infartuata e un miglioramento della contrattilità locale (Janssens S. *et al.*, 2006). Lo studio condotto da Chen e collaboratori ha dimostrato un

**Tabella 1.2.** Principali trails clinici con iniezione di cellule staminali umane dopo infarto miocardico acuto (Ricardo Sanz-Ruiz R *et al.*, 2010; George J.C. 2010)

Studio	Design	Tipo cellule	Cellule trapiantate	Timing	Follow-up	End point	Risultati
Strauer <i>et al.</i> 2002	NR C	BMMC	3*10 <sup>7</sup>	7 gg post-IMA	3 mesi	LVEF	Nessuna differenza
Assmus <i>et al.</i> 2002 TOPCARE-AMI	R NC	PBC BMMC	2*10 <sup>7</sup> 2*10 <sup>8</sup>	5 gg post-IMA	4 mesi	LVEF	+ 8% PB e +8% BM ma NGC
Kueth <i>et al.</i> 2004	NR NC	BMMC	4*10 <sup>7</sup>	6 gg post-IMA	12 mesi	LVEF	NGC
Chen <i>et al.</i> 2004	R C	MSC	9*10 <sup>9</sup>	18 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	+ 18%
Wollert <i>et al.</i> 2004 BOOST	R C	BMMC	2*10 <sup>9</sup>	5 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	+ 6%
Bartunek <i>et al.</i> 2005	NR C	BMMC	1*10 <sup>7</sup>	12 gg post-IMA	4 mesi	LVEF	+ 7%
Janssens <i>et al.</i> 2006	R C	BMMC	2*10 <sup>8</sup>	1 gg post-IMA	4 mesi	LVEF	Nessuna differenza
Ge <i>et al.</i> 2006 TCT-STAMI	R C	BMMC	4*10 <sup>7</sup>	1 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	+ 5%
Lunde <i>et al.</i> 2006 ASTAMI	R C	BMMC	7*10 <sup>7</sup>	6 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	Nessuna differenza
Schachinger <i>et al.</i> 2006 REPAIR-AMI 2006	R C	BMMC	2*10 <sup>8</sup>	4 gg post-IMA	4 mesi	LVEF	+ 3%
Meluzin <i>et al.</i> 2006	R C	Low BMMC High BMMC	1*10 <sup>7</sup> 1*10 <sup>8</sup>	7 gg post-IMA	3 mesi	LVEF	+ 3% Low BM + 5% High BM
Penicka <i>et al.</i> 2007	R C	BMMC	3*10 <sup>8</sup>	9 gg post-IMA	4 mesi	LVEF	Nessuna differenza
Tatsumi <i>et al.</i> 2007 TACT-PB-AMI	NR C	PBC	5*10 <sup>9</sup>	3 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	+ 6%
Huikuri <i>et al.</i> 2008 FINCELL	R C	BMMC	4*10 <sup>8</sup>	2-6 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	+ 5%
Tendera <i>et al.</i> 2009 REGENT	R C	NS-BMMC S-BMMC	2*10 <sup>8</sup> 2*10 <sup>6</sup>	3-12 gg post-IMA	6 mesi	LVEF	Nessuna differenza
Hirsh <i>et al.</i> 2011 HEBE	R C	PBC BMMC	-- --	3-8 gg post-IMA	4 mesi	LVEF	Nessuna differenza

NR = non randomizzato; C = controllato; R = randomizzato; BMMC = cellule mononucleate da midollo osseo (NS = non selezionate – S = selezionate); PBC = cellule del sangue periferico; IMA = infarto miocardico acuto; LVEF = frazione di eiezione del ventricolo sinistro; NGC = nessun gruppo di controllo

aumento della LVEF e della perfusione, ma questi risultati non sono stati duplicati (Chen S.L. *et al.*, 2004). Hare e collaboratori, invece, non hanno riscontrato miglioramenti né nella LVEF né nella perfusione dopo iniezione di BM-MSCs (Hare J.M. *et al.*, 2009).

Si evidenzia, pertanto, da questi dati l'enorme variabilità di *outcome* dei pazienti con IMA trattati con trapianto di cellule staminali.

#### **1.2.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI (MSCs)**

Focalizzando l'attenzione sulle cellule staminali mesenchimali (MSCs), esse sono cellule staminali stromali multipotenti presenti nel midollo osseo e in altri tessuti che possono differenziare in vari lineage tissutali come il tessuto osseo, cartilagineo, adiposo, muscolare scheletrico e cardiaco (Devine S.M. & Hoffman R., 2000; Koc Prockop D.J., 1997; Pittenger M.F. *et al.*, 1999).

Esse sembrano essere, tra le varie cellule staminali utilizzate, le più indicate all'uso clinico in quanto presentano delle caratteristiche peculiari che sono:

- multilinearità differenziativa (Pittenger M.F. *et al.*, 1999);
- capacità immunomodulante (Bifrari F. *et al.*, 2008);
- auto-rinnovamento (Deans R.J. & Moseley A.B., 2000);
- alto potenziale proliferativo (Krampera M. *et al.*, 2007);
- ampia e semplice espansione in coltura (Pittenger M.F. *et al.*, 2004).

Come descritto nel paragrafo 1.2.3, le BM-MSCs presentano, nei vari studi, risultati discordanti per quanto nella maggior parte dei casi si siano osservati un miglioramento della LVEF, della vascolarizzazione della zona infartuata e una riduzione dell'area ischemica. Nonostante l'intensa ricerca, i meccanismi sottostanti tali miglioramenti non sono ancora completamente chiariti (Dai W. *et al.*, 2012). Essi potrebbero riferirsi a fattori

paracrini rilasciati dalle cellule trapiantate (Murry C.E. *et al.*, 2005), alle capacità immunomodulanti delle BM-MSCs (Abumaree M. *et al.*, 2012), alla rigenerazione di miocardiociti *ex novo* (Orlic D. *et al.*, 2001) oppure alla capacità angiogenetica delle cellule staminali (Ma N. *et al.*, 2005). Per causare un problema cardiaco, l'ischemia deve colpire almeno il 25% del ventricolo sinistro (Caulfield J.B. *et al.*, 1976). Il cuore umano ha circa 20 milioni di miocardiociti per grammo di tessuto (Olivetti G. *et al.*, 1990) e il ventricolo sinistro pesa mediamente, in una popolazione di età media di  $49 \pm 17$  anni e di  $72 \pm 13$  Kg di peso, 123 gr. nell'uomo e 96 gr. nella donna (Hudsmith L.E. *et al.*, 2005). Come conseguenza esso contiene circa 2,5 miliardi di miocardiociti nell'uomo e 2 nella donna. Pertanto, il deficit minimo di miocardiociti per causare problemi cardiaci è di circa 625 milioni e una rigenerazione miocardiocitica vera dovrebbe ristabilire tale numero di cellule e assicurare la loro sincrona contrazione con il miocardio ospite attraverso le giunzioni elettromeccaniche (Murry C.E. *et al.* 2006). Inoltre è stato dimostrato che la LVEF presenta un miglioramento già dopo le prime 72h dal trapianto, tempo insufficiente per garantire una appropriata differenziazione, migrazione ed estensione delle cellule staminali iniettate (Shah V.K. *et al.*, 2011).

Tali osservazioni conducono pertanto alla conclusione che il miglioramento nella funzionalità cardiaca dopo trapianto di BM-MSCs non è presumibilmente dovuto alla rigenerazione cardiaca, ma potrebbe riferirsi a fattori paracrini rilasciati dalle cellule trapiantate, alle capacità immunomodulanti delle BM-MSCs, alla rigenerazione di miocardiociti *ex-novo*, oppure alla capacità angiogenetica delle cellule staminali (Mirotsou M. *et al.*, 2011)

In particolare, per quanto riguarda la rigenerazione miocardiocitica *ex novo*, molti studi hanno dimostrato un'effettiva rigenerazione miocardiocitaria con neovascolarizzazione derivante dalle cellule staminali trapiantate sia attraverso meccanismi di fusione cellulare

che di transdifferenziazione (Orlic D. *et al.*, 2001; Jackson K.A. *et al.*, 2001; Toma C. *et al.*, 2002; Orlic D. *et al.* 2003; Nygren J.M. *et al.*, 2004; Shah V.K. *et al.*, 2011). Per contro, tuttavia, altri studi non hanno ottenuto gli stessi risultati (Murry C.E. *et al.*, 2004; Balsam L.B. *et al.*, 2004; Chien K.R., 2004; Unlisted authors, 2004). Inoltre, Toma e collaboratori hanno dimostrato che il tasso di sopravvivenza delle BM-MSCs trapiantate in cuore di topo era inferiore allo 0,5% al 4° giorno post-trapianto (Toma *et al.*, 2002).

Si può concludere che i maggiori ostacoli per una strategia basata sull'uso di cellule staminali siano:

- I. la loro poca disponibilità post-trapianto (Song H. *et al.*, 2010);
- II. la presenza di molecole reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species* – ROS) che sono conosciute per essere dei mediatori chimici nelle disfunzioni cardiache, in quanto impediscono l'adesione cellulare e stimolano il distacco e la morte cellulare (Yao E.H. *et al.*, 2006; Pelegrin P. & Surprenant A., 2009; Sáenz-Morales D. *et al.*, 2009; Zhu W.G., *et al.* 2009);
- III. la presenza di condizioni di ischemia con mancanza di fattori nutrienti e ossigenati che possono modificare la disponibilità cellulare delle BM-MSCs trapiantate (Ingber D.E., 2002; Mylotte L.A. *et al.*, 2008).

Inoltre, è stato dimostrato che l'ischemia miocardica genera una potente risposta infiammatoria con produzione di radicali liberi e citochine infiammatorie che possono aumentare la morte cellulare e l'iniziale apoptosi (Frangogiannis N.G., 2006). Tutti questi ostacoli non sono, comunque, considerati fattori che impediscono il loro studio e il loro uso, in quanto le BM-MSCs possono reagire diversamente a tutti questi stimoli grazie alla loro intensa capacità immunomodulante garantendosi, nonostante l'ambiente estremamente difficile, una buona vitalità e una soddisfacente plasticità (Song H. *et al.*, 2010).



## 2. SCOPO

Il modello murino di infarto miocardico acuto (IMA) è uno dei modelli più utilizzati nell'ambito della ricerca scientifica. L'uso di cellule staminali, in modo particolare delle cellule staminali mesenchimali da midollo osseo umano (BM-MSCs), per la terapia dell'IMA, è argomento di acceso dibattito e di profondo studio sia per quanto riguarda il miglioramento clinico sia per la possibilità di rigenerazione di miocardiociti *ex novo* che le BM-MSCs offrono.

Gli scopi di questo lavoro vogliono valutare diversi aspetti legati a questo tipo di studi, e in modo particolare, quelli inerenti:

- al perfezionamento delle tecniche di prelievo, isolamento ed espansione delle BM-MSCs umane e alla valutazione delle loro capacità differenziative e immunomodulanti;
- alla valutazione della permanenza delle BM-MSCs trapiantate nel breve periodo (24, 48 e 72h) attraverso l'uso di cellule transfettate con TAT-GFP+;
- alla valutazione della compartecipazione delle BM-MSCs nei processi riparativi conseguenti l'IMA.

In ultimo, ma non per questo meno importante, questo progetto si è posto lo scopo della ricerca della tecnica chirurgico-anestesiologica che potesse aumentare la percentuale di successo operatorio e ridurre, di conseguenza, il numero di animali utilizzati. Tale scopo potrebbe, pertanto, soddisfare gli importanti e fondamentali *Principi delle 3R*, che posso brevemente essere riassunti come:



- Replacement: inteso come la possibilità di evitare o sostituire l'uso di animali nella ricerca che ha il potenziale di causare dolore;
- Refinement: inteso come il perfezionamento delle procedure e delle manipolazioni che producono o possono produrre dolore, sofferenza, stress in modo tale da aumentare il benessere animale negli studi che non possono evitare l'utilizzo degli stessi
- Reduction: inteso come l'utilizzo di metodi che minimizzano l'uso di animali permettendo al ricercatore di ottenere livelli comparabili di informazioni con un numero minore di animali o, con lo stesso numero di animali, un livello superiore di informazioni minimizzando il futuro utilizzo di ulteriori soggetti.

Tali Principi sono divenuti, nel corso dell'ultimo decennio, indispensabili e necessari per ogni ricerca scientifica (Farnaud S. The evolution of the Three Rs. ATLA 2009:37; 249-254; <http://www.nc3rs.org.uk>).

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 ORGANIZZAZIONE DEL PROGETTO

Questo Progetto è stato svolto dal Dipartimento di Biomedicina Comparata e Scienze Alimentari – Sezione di Anatomia Patologica – dell’Università degli Studi di Padova in collaborazione con il Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d’Organo, Cellule, Tessuti e Medicina Rigenerativa (Corit) di Padova, con il Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari – Sezione di Anatomia Patologica – dell’Università degli Studi di Padova e con il Laboratorio Universitario di Ricerca Medica (LURM) – Sezione Ematologia – dell’Azienda Ospedaliera – Policlinico di Verona.

Il Progetto è stato suddiviso in 3 fasi, non propedeutiche l’una all’altra, che si sono, in taluni periodi, anche sovrapposte temporalmente. Per una maggior chiarezza espositiva, esse possono essere suddivise in:

- **Fase 1:** prelievo, espansione e valutazione delle capacità differenziative e immunomodulanti delle cellule staminali mesenchimali da midollo osseo umano (BM-MSCs); transfezione con il trans-attivatore di trascrizione (TAT)-GFP+;
- **Fase 2:** perfezionamento della tecnica chirurgico-anestesiologica di induzione di infarto miocardico acuto (IMA) nel topo in linea con i Principi delle 3R (Replacement, Reduction, Refinement) come dettagliato nel precedente Capitolo;
- **Fase 3:** valutazione della permanenza delle BM-MSCs trapiantate nel breve periodo, inteso come 24, 48 e 72h post-trapianto, attraverso l’uso di cellule transfettate con

TAT-GFP<sup>+</sup>, e della loro partecipazione nei processi riparativi conseguenti l'IMA a 1, 2 e 4 settimane.

### 3.2 MODELLO ANIMALE

In questo lavoro sono stati sottoposti a procedura di induzione di infarto miocardico acuto chirurgicamente indotto 159 topi Balb/c Athymic Nude-Fox1<sup>nu</sup> (Harlan Laboratories, San Pietro al Natisone – Udine – Italy). La popolazione murina è stata di età compresa tra le 15 e le 17 settimane (media 16,0 ± 0,99 dev. st. – mediana 15,9) con un peso compreso tra i 25,9 e i 32,1 gr. (media 29,3 ± 1,69 – mediana 28,9). Tale popolazione è stata stabulata presso lo Stabulario del polo universitario Agripolis – Università degli Studi di Padova – in condizioni controllate, a temperatura e umidità costante con luce programmata. Gli animali sono stati alimentati con cibo specifico per roditori e con acqua *ad libitum*. Tutti gli animali sono stati esaminati presso il Laboratorio Harlan contro virus, batteri, Mycoplasma, funghi, parassiti e altre malattie. La scelta è ricaduta su questa specie murina in quanto, presentando una immunodeficienza derivante dalla mancata produzione di linfociti T, si è cercato di ridurre il più possibile l'insulto immunitario verso le cellule trapiantate.

Tutte le procedure descritte in questo progetto sono conformi alla *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* pubblicato da US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996, A3227-01) e alla Legge Italiana D. Lgs. 116/92. Inoltre il lavoro è stato approvato dal Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (C.E.A.S.A.) con Prot. n. 16174/10. Il progetto, oltre a ciò, è stato condotto sotto la supervisione del Comitato Etico Istituzionale e del Servizio Veterinario d'Ateneo dell'Università degli Studi di Padova.

Gli animali sono stati randomizzati e divisi in 5 gruppi (Tabella 3.1) come descritto di seguito:

Gruppo 1: gli animali (n. 60) sono stati sottoposti a chirurgia di induzione di IMA attraverso la legatura della coronaria anteriore discendente di sinistra (LAD) e al trapianto di BM-MSCs.

L'*end-point* del gruppo è stato fissato a:

- 24h: Gruppo 1a – n. 10;
- 48h: Gruppo 1b – n. 10;
- 72h: Gruppo 1c – n. 10;
- 1 settimana: Gruppo 1d – n. 10;
- 2 settimane: Gruppo 1e – n. 10;
- 4 settimane: Gruppo 1f – n. 10.

Gruppo 2: gli animali (n. 60) sono stati sottoposti solamente alla legatura dell'arteria coronaria LAD senza iniezione di BM-MSCs o mezzo di sospensione.

L'*end-point* del gruppo è stato fissato a:

- 24h: Gruppo 2a – n. 10;
- 48h: Gruppo 2b – n. 10;
- 72h: Gruppo 2c – n. 10;
- 1 settimana: Gruppo 2d – n. 10;
- 2 settimane: Gruppo 2e – n. 10;
- 4 settimane: Gruppo 2f – n. 10.

Gruppo 3: gli animali (n. 12) sono stati sottoposti alla legatura dell'arteria coronaria LAD con successiva iniezione del solo mezzo di sospensione delle BM-MSCs.

L'*end-point* del gruppo è stato fissato a:

- 24h: Gruppo 3a – n. 3;
- 72h: Gruppo 3b – n. 3;
- 2 settimane: Gruppo 3c – n. 3;
- 4 settimane: Gruppo 3d – n. 3.

Gruppo 4: gli animali (n. 15) sono stati sottoposti alla sola iniezione di BM-MSCs senza induzione di IMA.

L'*end-point* del gruppo è stato fissato a:

- 24h: Gruppo 4a – n. 5;
- 48h: Gruppo 4b – n. 5;
- 72h: Gruppo 4c – n. 5;

Gruppo 5: gli animali (n. 12) sono stati sottoposti alla sola toracotomia.

L'*end-point* del gruppo è stato fissato a:

- 24h: Gruppo 5a – n. 3;
- 72h: Gruppo 5b – n. 3;
- 2 settimane: Gruppo 5c – n. 3;
- 4 settimane: Gruppo 5d – n. 3

All'interno del gruppo 2 in cui i soggetti sono stati sottoposti solo ad induzione di IMA, gli animali sono stati ulteriormente randomizzati per valutare:

- le differenti tempistiche e tecniche anestesologiche
- le differenti tempistiche chirurgiche
- l'influenza della posizione del paziente sul successo operatorio

**Tabella 3.1.** Suddivisione dei gruppi sperimentali per procedura e tempistica

End-point	MSC + IMA	IMA ONLY	IMA + D-MEM	MSC ONLY	CONTROLLO	TOTALE
24h	10	10	3	5	3	31
48h	10	10	--	5	--	25
72h	10	10	3	5	3	31
1w	10	10	--	--	--	20
2w	10	10	3	--	3	26
4w	10	10	3	--	3	26
<b>Totale</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>159</b>

MSC = cellule staminali mesenchimali; IMA = infarto miocardico acuto; D-MEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

Le differenti tecniche anestesiolgiche e i posizionamenti dei pazienti sul tavolo operatorio verranno esaurientemente illustrati nel paragrafo 3.3. Qui si vuole solo evidenziare che il Gruppo 2, come riportato in Tabella 3.2, è stato randomizzato in due sottogruppi (n. 30) con posizionamento chirurgico in decubito latero-laterale destro (LR) e decubito supino (SR). Questi due sottogruppi sono stati ulteriormente randomizzati in 3 gruppi (n. 10) identificati con l'utilizzo della tracheotomia (TT-LR e TT-SR), dell'intubazione endotracheale (ET-LR e ET-SR) e l'uso di maschera senza intubazione (NI-LR e NI-SR) per valutare le differenti tecniche anestesiolgiche.

**Tabella 3.2.** Randomizzazione del gruppo 2 per decubito e procedura anestesiolgica

Tecnica/decubito	ET	TT	NI	Totale
<b>RL</b>	10	10	10	<b>30</b>
<b>SR</b>	10	10	10	<b>30</b>
<b>Totale</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>60</b>

RL = decubito laterale destro; SR = posizione supina; ET = intubazione endotracheale; TT = intubazione per tracheotomia; NI = non intubati

### 3.3 MODELLO CHIRURGICO-ANESTESIOLOGICO

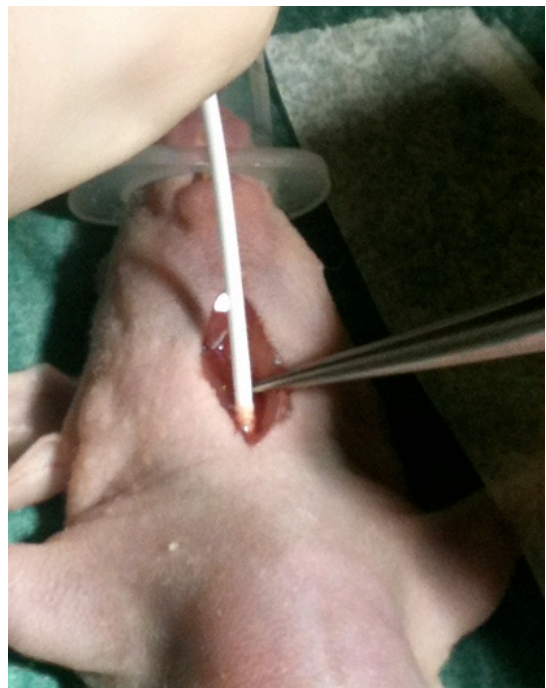
Tutti gli animali sono stati anestetizzati con isofluorano attraverso l'uso di una camera di induzione. Per i gruppi che hanno subito la procedura di intubazione, la frequenza respiratoria è stata impostata a 120 atti per minuto con pressione inspiratoria di 16 cm H<sub>2</sub>O. La temperatura della stanza era compresa tra i 24 e i 26°C e i soggetti sono stati posti su una piattaforma chirurgica riscaldata a 37°C.

Per i gruppi ET-LR e ET-SR è stata utilizzata una tecnica simile a quella descritta da Brown R.H. (Brown R.H. *et al.*, 1999) e da Spoelstra E.N. (Spoelstra E.N. *et al.*, 2007) con alcune varianti personali, come il differente posizionamento del paziente per l'intubazione e i differenti metodi contenitivi.

Per ogni procedura chirurgico-anestesiologica, gli animali sono stati posizionati sulla piattaforma riscaldata a 37°C con la testa rivolta verso il chirurgo e vicino al bordo del tavolo operatorio. Il naso dell'animale è stato contenuto attraverso l'utilizzo di un elastico passante dietro ai denti incisivi e fissato ai bordi della piattaforma riscaldata. La faringe è stata poi illuminata dall'esterno con due luci endoscopiche fredde per aumentare la visibilità della glottide e successivamente è stata applicata una goccia di lidocaina con l'uso di una siringa da insulina da 1ml/26G come prevenzione ad eventuali movimenti riflessi durante le procedure di intubazione. Con una pinza curva, la lingua è stata tenuta premuta verso il pavimento mandibolare e lievemente trazionata per permettere la visualizzazione delle corde vocali e della trachea: un catetere intravenoso da 20G è stato quindi inserito delicatamente nella trachea per 7-10 mm circa. Il successo della procedura è stato verificato attraverso l'uso di un specchietto da dentista mantenuto a -20°C che, nel caso di una corretta intubazione, si appannava. Immediatamente dopo l'intubazione e la verifica della corretta procedura, il tracheotubo è stato collegato ad una unità respiratoria Fluovac

Isoflurane/Halotane Scavanger (Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) provvista di filtro assorbente.

Per i gruppi TT-LR e TT-SR, invece, è stato utilizzato un protocollo simile a quello descritto da Kolk M.V.V. e collaboratori (Kolk M.V.V. *et al.*, 2009). L'animale è stato posto sulla piattaforma riscaldata a 37°C con la coda rivolta verso il chirurgo e, attraverso l'uso di una maschera facciale appositamente adattata per la specie murina, è stata mantenuta l'anestesia totale per via inalatoria. Attraverso l'uso di un microscopio operatorio, è stata effettuata una incisione di circa 10-13 mm sulla linea mediana del collo tra la laringe e l'inizio del torace per esporre e separare i muscoli del collo e il tessuto connettivo che copre la trachea. Con una forbice operatoria per microchirurgia la trachea è stata sezionata trasversalmente per circa il 50-60% del suo diametro nella porzione



**Figura 3.1.** Procedura di intubazione tramite tracheotomia. Dissezione dei muscoli del collo e tomia della trachea e intubazione con cannula 20G

compresa tra il 4°-5° o 5°-6° anello tracheale. Effettuata la tomia, essa è stata aperta con una micropinza operatoria retta da 0,2 mm per inserire al suo interno un catetere intravenoso 20G (Figura 3.1). Dopo aver verificato che entrambe i polmoni fossero ventilati, il tubo endotracheale è stato collegato ad una unità respiratoria Fluovac Isoflurane/Halotane Scavanger (Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) provvista di filtro assorbente.

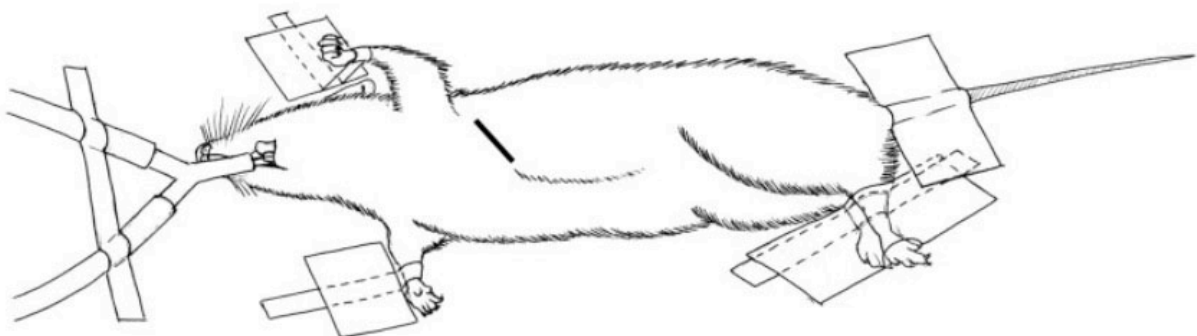
Per la valutazione della durata della procedura anestesiológica, il cronometro è stato fatto partire, per quanto concerne i gruppi ET, nell'istante in cui l'animale era



correttamente posizionato e il chirurgo pronto per effettuare la procedura. Per quanto riguarda i gruppi TT invece, la misurazione della procedura era la somma di due differenti fasi: la prima che andava dall'incisione della cute del collo fino all'intubazione tracheotomica e la seconda dall'estubazione fino alla chiusura della trachea e dei muscoli del collo.

Per la chirurgia in decubito laterale destro (LR) è stato utilizzato un metodo simile a quello descritto da Tarnavski O. e collaboratori (Tarnavski O. *et al.*, 2004). Dopo intubazione, l'animale è stato posizionato con le zampe posteriori verso il chirurgo e l'arto anteriore destro, in appoggio sulla piattaforma riscaldata (37°C), è stato ancorato perpendicolarmente all'asse longitudinale del torace mentre l'arto anteriore sinistro è stato gentilmente esteso in verticale e fissato dietro la testa. Le zampe posteriori, ancorate insieme, sono state trazionate leggermente in direzione caudale (Figura 3.2).

**Figura 3.2.** Fissaggio del topo per la chirurgia e localizzazione dell'incisione per il modello di infarto miocardico acuto (Tarnavski O. *et al.*, 2004)

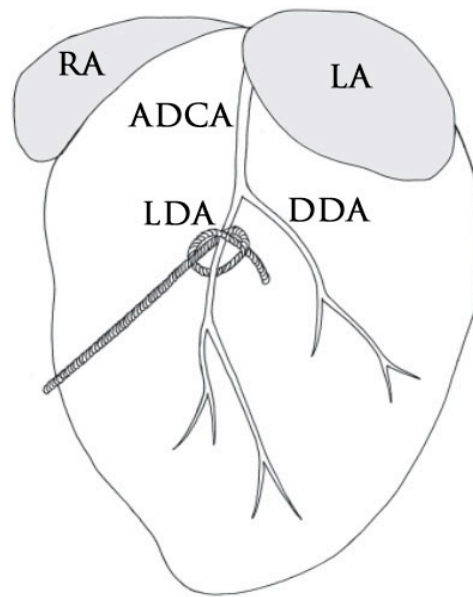


Posizionamento per l'intervento di induzione di IMA in decubito laterale destro (LR).  
La breccia chirurgica è stata effettuata a livello del 4° spazio intercostale. Il tratto nero individua la breccia cutanea.

Dopo aver effettuato uno scrub chirurgico con soluzione di povidone-iodato e 70% di alcool, è stata effettuata una incisione di circa 7 mm dal bordo sternale sinistro verso l'ascella sinistra evitando la resezione delle vene toraciche superficiali. Successivamente, per esporre la parete toracica, sono stati dissezionati i muscoli pettorale maggiore sinistro, il retto toracico sinistro e il muscolo serrato anteriore. La cavità toracica è stata dunque aperta con l'uso di una microforbice Müller (Aesculap FM011R, Croma Gio.batta, Padua, Italy) a livello del 4° spazio intercostale seguendo il bordo craniale della 5° costa per evitare di danneggiare il fascio vascolo-nervoso presente al bordo caudale della 4° costa. Per evitare intense e pericolose emorragie, in questa fase è stata posta molta attenzione onde evitare l'arteria mammaria interna sinistra che decorre parallela allo sterno a livello della giunzione sterno-costale. Non è stato utilizzato un retrattore costale in quanto, nella nostra esperienza, esso aumentava la difficoltà di gestione dei microstrumenti all'interno della cavità toracica incrementando le probabilità di danno, dovuti a involontari movimenti secondari, delle sottili e fragili coste del topo.

Una volta individuato il cuore, il grasso pericardico è stato rimosso procedendo, successivamente, ad una pericardiectomia: questo il momento in cui veniva identificata l'arteria coronaria anteriore discendente di sinistra (LAD). Essa, visibile come un vaso rosso decorrente dall'atrio sinistro verso l'apice del cuore, è stata individuata e sottoposta a legatura con un punto singolo intramiocardico di filo Prolene 8-0 a circa 1-2 mm dalla sua insorgenza dall'atrio sinistro (Figura 3.3). Per prevenire ed evitare la formazione di pneumotorace iatrogeno, prima della chiusura del torace si inseriva, a livello del 7-8° spazio intercostale, un catetere venoso da 22G da cui si aspirava l'aria all'atto della chiusura del torace. Quest'ultimo, così come i muscoli e la cute, è stato chiuso con nodi singoli di filo Prolene 6-0.

**Figura 3.3.** Pattern delle arterie coronarie del topo e posizionamento della legatura



Magnificazione della sola arteria coronaria anteriore discendente del cuore di topo. La legatura con punto piano singolo è stata effettuata immediatamente dopo la divisione della ADCA in LDA e DDA.

RA = atrio destro; LA = atrio sinistro; ADCA = arteria coronaria anteriore discendente; LDA = arteria coronaria anteriore discendente di sinistra; DDA = arteria coronaria anteriore discendente di destra (Wang J. et al., 2006 - modificato)

Per le chirurgie in posizione supina (SR) è stato utilizzato un metodo simile a quello descritto da Salto-Tellez M. e collaboratori (Salto-Tellez M. *et al.*, 2004). Dopo intubazione, l'animale è stato posto in posizione supina sulla piattaforma riscaldata (37°C) con la coda rivolta verso il chirurgo. Tutti e quattro gli arti sono stati fissati in direzione radiale ed è stato effettuato uno scrub chirurgico come precedentemente descritto. È stata quindi effettuata una incisione di circa 5 mm dal lato sinistro dello sterno verso l'ascella sinistra e la dissezione dei muscoli come già riportato. La parete toracica è stata aperta a livello del 3-4° spazio intercostale in accordo con la posizione del cuore e, una volta individuato l'organo, è stato sollevato il grasso cardiaco con esecuzione della pericardiectomia. Successivamente l'arteria coronaria LAD è stata facilmente individuata e legata come descritto per le chirurgie dei gruppi LR. La tecnica per la prevenzione del pneumotorace

iatrogeno e la chiusura del torace, dei muscoli e della cute, è stata la stessa descritta precedentemente.

### **3.3.1 TRAPIANTO DI BM-MSCs TAT-GFP+ IN CUORI POST-IMA**

Nei gruppi con (gruppi 1, 2 e 3) o senza (gruppo 4) induzione di IMA, sono state trapiantate  $3 \cdot 10^5$  cellule TAT-GFP+ sospese in 45  $\mu$ l di D-MEM, divise in 3 singole iniezioni, attraverso l'utilizzo di una siringa Hamilton con ago da 30G (Mod. 705, 50  $\mu$ l, Titolchimica S.p.A., Rovigo, Italy). Dopo 20 minuti dalla legatura dell'arteria coronaria LAD, sono state effettuate, ai bordi dell'area infartuata, 3 singole iniezioni di  $1 \cdot 10^5$  di cellule sospese in 15  $\mu$ l: la prima a destra del nodo di sutura 1-2 mm ventralmente, la seconda allo stesso livello ma a sinistra e la terza a livello dell'apice del cuore. Per il gruppo 3 l'iniezione è stata, come precedentemente riportato, del solo mezzo di sospensione D-MEM senza BM-MSCs TAT-GFP+.

## **3.4 CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE DA MIDOLLO OSSEO (BM-MSCs)**

Come precedentemente descritto, le cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BM-MSCs) sono una rara sottopopolazione dello stroma midollare osseo con multi potenzialità (Nardi N. *et al.*, 2006).

### **3.4.1 PROCEDURE DI PRELIEVO**

L'aspirato di sangue midollare è stato effettuato su 5 pazienti sani e dopo consenso informato utilizzando tecniche standard di prelievo dalla cresta iliaca posteriore superiore (Focosi D., 2010).

Dopo preparazione del campo operatorio tramite disinfezione chirurgica con soluzione antisettica di povidone-iodato e alcool 70%, si è praticata anestesia locale dell'area mediante infiltrazione fino al periostio di xilocaina 2%. Dopo circa 5-10 minuti per attendere il picco di efficacia dell'anestetico locale, si è inserito l'ago da aspirato midollare nella cresta iliaca fino a penetrare nella cavità midollare da dove, dopo estrazione del mandrino, si sono aspirati 15 ml di sangue midollare in una siringa con 250 UI di eparina.

### **3.4.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE BM-MSCs**

Dopo il prelievo, il sangue è stato stratificato su Fycoll-Paque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e centrifugato a 600 g per 20 minuti a temperatura ambiente in assenza di freno. L'anello di cellule mononucleate è stato prelevato e diluito in soluzione PBS e le cellule sono state messe in coltura in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> (BD Falcon, Becton Dickinson, Milano, Italy) alla concentrazione di  $1,2 \times 10^6$  cellule nucleate.

Dopo 72h le fiasche sono state lavate con PBS per eliminare le cellule non aderenti e la coltura è stata arricchita con Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM). Al terreno di coltura, portato ad elevata concentrazione di glucosio, è stato aggiunto Glutamax, 18% heatinactivated adult bovine serum, 100 U/ml di penicillina, and 100 µg/ml streptomina (tutti da Gibco, Milan, Italy). Successivamente, la coltura è stata incubata a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

Quando le cellule aderenti hanno raggiunto una confluenza del 70-80%, venivano tripsinizzate (0,05% di tripsina a 37°C per 5 minuti), raccolte ed espanse in fiasche di superficie maggiore ad una concentrazione più bassa (1000-2000 cellule/cm<sup>2</sup>). Una popolazione omogenea viene solitamente raggiunta in circa 1-2 settimane di coltura e al terzo passaggio (P3) si è ottenuto un numero di cellule circa 200 volte il numero iniziale. Ogni 2-3 giorni il terreno è stato rinnovato.

Una volta ottenute una popolazione pura di cellule, esse sono state esaminate per la loro definitiva caratterizzazione. La International Society for Cellular Therapy ha definito i criteri minimi per definire una cellula come staminale mesenchimale, ed essi sono:

- 1) devono possedere una aderenza plastica in normali condizioni di cultura;
- 2) devono esprimere il CD 73, il CD 90 e il CD 105 ed essere negativi al CD14 o CD11b, CD 34, CD45, CD79alfa o CD19 e HLA-DR;
- 3) devono differenziare in osteoblasti, condroblasti e adipociti in vitro (Dominici M. *et al.*, 2006).

#### 3.4.2.1 IMMUNOMODULAZIONE

Le BM-MSCs sono state poste in cocoltura insieme a PBMC (peripheral blood mononuclear cells) ottenuti da sangue periferico di donatori sani. I PBMC sono stati stimolati a proliferare utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro il CD3 e il CD28, la cui attivazione induce una massiva proliferazione cellulare (5-7 divisioni cellulari). Per visualizzare tale proliferazione i PBMC sono stati marcati, prima della cocoltura, con il CFSE (carbossifluoresceina diacetato succimidil estere), una molecola fluorescente che si lega alle proteine cellulari e permette, sfruttando l'uguale distribuzione delle proteine in seguito a divisione cellulare, di conoscere l'esatto numero di generazioni a cui i PBMC sono andati incontro.

Per visualizzare l'inibizione della proliferazione da parte delle MSCs, quest'ultime sono state cocoltivate con PBMC attivati in rapporto PBMC:MSC 5:1 e 50:1 per sei giorni. Al sesto giorno i PBMC sono stati raccolti, marcati con il CD45 e TO-PRO3 (marcatore di vitalità) e analizzate al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Oxford, UK). La percentuale dei PBMC proliferanti in cocoltura con le MSC è stato rapportato alla proliferazione dei PBMC coltivati da soli per ottenere la percentuale di proliferazione relativa. Per comparare la

proprietà immunomodulatoria dei cinque campioni prelevati, sono stati utilizzati i PBMC dello stesso donatore al fine di escludere variabilità legate a donatori diversi.

#### 3.4.2.2 DIFFERENZIAZIONE VERSO LE LINEE MESENCHIMALI

Al fine di valutare il potenziale differenziativo delle BM-MSCs dopo espansione, le cellule sono state coltivate in presenza di fattori che inducono l'attivazione di specifiche vie di segnalazione che inducono il differenziamento.

Il differenziamento adipocitario è stato ottenuto coltivando le MSC con 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX), desametasone ed insulina per 2 settimane, al termine delle quali le cellule sono state colorate con Oil-Red-O per evidenziare la presenza di vacuoli lipidici, indice dell'avvenuto differenziamento.

Il differenziamento osteocitario stato ottenuto coltivando per 3 settimane le BM-MSCs con  $\beta$ -glicerofosfato, acido ascorbico e desametasone; successivamente è stato eseguito una colorazione immunostochimica per la fosfatasi alcalina (ALP), la cui espressione indica il differenziamento verso il lineage osteocitario.

Il differenziamento condrocitario è ottenuto tramite coltura delle BM-MSCs in pellet in presenza di TGF- $\beta$ 1, desametasone, piruvato di sodio, prolina e ITS Premix (Insulina, transferrina e acido selenioso). Dopo 2 settimane il pellet è stato fissato in Septosol®, incluso in paraffina e colorato con blu di toluidina per evidenziare la deposizione di proteoglicani e glicosamminoglicani.

### 3.4.3 FENOTIPIZZAZIONE

#### 3.4.3.1 POST-PRELIEVO

Le cellule sono state fenotipizzate, per quanto riguarda gli esami post-espansione post-prelievo per la positività all'espressione dei marcatori mesenchimali (CD73, CD90, CD105, CD146 e HLA-ABC) e la negatività dei marcatori ematopoietici/endoteliali (CD31, CD34, CD45, CD106 e HLA-DR).

Le cellule, in numero di  $2 \times 10^6$ , sono state risospese in 100  $\mu$ l di PBS e incubate con 10  $\mu$ l dello specifico marcatore per 10 minuti a temperatura ambiente; al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo, successivamente le cellule sono state risospese in 200  $\mu$ l di PBS e analizzate al citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Oxford, UK). Per ogni anticorpo è stato utilizzato lo specifico controllo isotipico.

Successivamente le cellule sono state congelate in azoto liquido in attesa della marcatura e dell'utilizzo *in vivo*.

#### 3.4.3.2 POST-TRANSFEZIONE PRE-IMPIANTO

Al momento dell'utilizzo, le cellule sono state scongelate in terreno di coltura completo, costituito da D-MEM (Euroclone S.p.A. – Milano – Italy), 20% di siero fetale bovino (FBS) (Euroclone S.p.A. – Milano – Italy), 20 mM L-Glutammina (Sigma Aldrich, United Kingdom) e 0,1% di penicillina/streptomina 100U/mml (Euroclone S.p.A. – Milano – Italy) alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule. Ogni 48h il terreno di coltura è stato cambiato fino al raggiungimento di una confluenza di circa il 70% ottenuto incubando le cellule in termostato 37°C con 5% CO<sub>2</sub>: la resa finale è stata di circa  $2,5 \times 10^6$  cellule.



Per ottenere le BM-MSCs pronte per la transfezione con TAT-GFP<sup>+</sup>, il terreno di coltura è stato eliminato per decantazione e i detriti presenti sono stati eliminati con doppio lavaggio di PBS sterile (Euroclone S.p.A. – Milano – Italy). Successivamente le BM-MSCs sono state staccate utilizzando una soluzione di tripsina 0,05% / EDTA 0,02% sterile in PBS (Euroclone S.p.A. – Milano – Italy) agitando delicatamente per pochi secondi le fiasche. L'azione della tripsina è stata bloccata trasferendo immediatamente le BM-MSCs in terreno di coltura freddo (4°C – rapporto soluzione di tripsina/cellule su terreno di coltura 1:1) centrifugando il campione a 400 g a 4°C per 5 minuti. Il pellet è stato successivamente risospeso in terreno di coltura, le cellule sono state contate mediante test di esclusione del Trypan blue e risospese in D-MEM alla concentrazione di 3x10<sup>5</sup> cellule in 45 µl, per quanto concerne i campioni finalizzati all'inoculo *in vivo*, e di 0,5x10<sup>5</sup> cellule, per quanto concerne i campioni diretti all'esame citofluorimetrico.

Per la tecnica di trapianto delle BM-MSCs nel cuore murino, si rimanda al paragrafo 3.3.1, mentre per gli esami citofluorimetrici tutte le BM-MSCs, transfettate o meno con TAT-GFP<sup>+</sup>, state caratterizzate, prima dell'inoculo, tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali per valutare l'espressione dei marcatori cellulari e della GFP utilizzando un citofluorimetro FACSCalibur (BD Biosciences, Oxford, UK). Dopo opportuna diluizione, un'aliquota corrispondente a 5x10<sup>5</sup> cellule è stata posta in una provetta da citofluorimetro. Dopo un ulteriore lavaggio delle cellule con 1 ml di PBS-0,5 % BSA-0,1 %NaN<sup>3</sup>, i campioni sono stati addizionati con le opportune quantità di anticorpo. Il legame con l'anticorpo è stato effettuato mantenendo le cellule in frigo a 4°C per 30 minuti al buio. Al termine dell'incubazione, l'anticorpo non legato è stato allontanato effettuando un lavaggio con PBS-0,5%-BSA-0,1% NaN<sup>3</sup>. La risospensione finale del pellet è stata effettuata in 200 µl di PBS, a cui sono stati aggiunti 50 µl di PBS-HCHO (formaldeide) 0,1%.

Le valutazioni in citofluorimetria singola e doppia sono state effettuate con anticorpi monoclonali diretti contro il GFP, il CD73, il CD105 e l'HLA-ABC, per quanto riguarda i

marcatori mesenchimali, e contro il CD40, CD54, CD80, CD86, CD106 e HLA-DR per quanto concerne quelli endoteliali/ematopoietici. Come controllo aspecifico sono state utilizzate delle immunoglobuline IgG aspecifiche utilizzate alla stessa concentrazione degli anticorpi specifici; l'analisi citofluorimetrica dei controlli aspecifici ha permesso di posizionare negli istogrammi il cursore, durante l'acquisizione dei dati, al fine di avere una positività inferiore al 2%, per poter analizzare i campioni in esame.

### **3.5 MODELLO DI TRANSFEZIONE**

#### **3.5.1 GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)**

La Green Fluorescent Protein (GFP) è una proteina di 238 aminoacidi del peso di 26,9 kDa che presenta una caratteristica fluorescenza in verde nello spettro di luce che va dal blu all'ultravioletto (Prendergast F. & Mann K., 1978; Tsien R., 1998). Sebbene molte specie marine presentino al loro interno la GFP, essa viene tradizionalmente associata alla specie in cui per la prima volta è stata scoperta ed isolata tale proteina, la medusa *Aequorea victoria*. Nei primi anni '60, Shimomura O. e collaboratori hanno scoperto, isolato e posto le basi per il l'utilizzo nella ricerca scientifica di questa proteina bioluminescente, lavoro per il quale vinsero il Premio Nobel per la Chimica nel 2008 (Shimomura O. *et al.*, 1962). Negli ultimi decenni, i geni che codificano per questa proteina hanno subito molte mutazioni da parte dei ricercatori (Heim R. *et al.*, 1995; Pédelacq J. *et al.*, 2006) allo scopo di venire incontro alle esigenze dei ricercatori stessi.

Quella utilizzata nel nostro studio è stata la E-GFP con mutazione puntiforme F64L che aumenta la fluorescenza a 37°C, temperatura presente all'interno dei mammiferi rendendola, pertanto, ideale per l'uso in tale classe di animali (Thastrup O. *et al.*, 2001).

### **3.5.2 TRANS-ATTIVATORE DI TRASCRIZIONE (TAT)**

Il trans-attivatore di trascrizione (TAT) è un gene del virus dell'HIV consistente di 86-101 amminoacidi a seconda del subtipo (Jeang, K. T., 1996). In biologia molecolare viene definita TAT anche la proteina codificata dal gene TAT ed essa presenta la caratteristica di aumentare drasticamente l'efficienza di trascrizione virale (Debaisieux S. *et al.*, 2012). Scoperto in contemporanea da Frankel e Pabo (Frankel A.D. & Pabo C.O., 1988) e da Green and Loewenstein (Green M. & Loewenstein P.M., 1988), il gene TAT contiene un dominio di trasduzione proteica, conosciuto anche come *cell penetrating peptide* (CPD) con sequenza amminoacidica YGRKKRRQRRR (Schwarze S.R. *et al.*, 2000), che incrementa esponenzialmente la capacità della proteina TAT di penetrare la membrana citoplasmatica facendola così diventare un carrier ideale per il trasporto trans-membrana di molecole anche di grosse dimensioni (Dietz G.P. & Bähr M., 2004).

### **3.5.3 TRANSFEZIONE DI BM-MSCs CON TAT-GFP+**

Le BM-MSCs umane sono state scongelate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> come descritto nel paragrafo 3.4.3.2 e, raggiunta una confluenza di circa il 70%, esse sono state lasciate in coltura per 1 h in D-MEM senza siero. Successivamente le BM-MSCs sono state incubate per 2 h con D-MEM contenente la TAT-GFP+ alla concentrazione di 2 µM.

Al termine dei processi di incubazione, le cellule sono state staccate mediante tripsina/EDTA ed utilizzate per l'inoculo *in vivo*.

## **3.6 STUDI ISTOPATOLOGICI**

All'end-point stabilito per ogni gruppo, i topi sono stati sottoposti ad eutanasia per overdose intraperitoneale di anestetici (ketamina e xilazina diluiti in soluzione fisiologica).

Su tutti i cuori prelevati sono stati eseguiti gli esami di istologia standard, di immunoistochimica e di immunofluorescenza.

### **3.6.1 ISTOLOGIA STANDARD**

Dopo l'eutanasia, i cuori sono stati immediatamente prelevati in campo chirurgico sterile, lavati con soluzione fisiologica a temperatura ambiente e fissati in formalina fresca al 10%, pH 7,25.

Metà dei cuori sono stati randomizzati e sezionati longitudinalmente dall'apice a metà della base con sezione passante al centro dei tre differenti siti di inoculo, mentre l'altra metà è stata sezionata trasversalmente a circa metà dell'asse ventricolare sinistro sempre con linea di sezione passante al centro dei 3 siti di inoculo delle BM-MSCs.

Il tessuto è stato quindi processato secondo le procedure standard e sono state prelevate 3 sezioni consecutive di 4 µm di spessore ogni 50 µm. Le sezioni sono state colorate con ematossilina-eosina (H&E) e con colorazione tricromica di Masson e valutate con un microscopio Olympus BX40 (Olympus S.r.l., Milano, Italia).

Tutti i maggiori visceri – polmoni, fegato, milza, rene sinistro, rene destro, pancreas, stomaco, duodeno, ileo, colon e vescica – sono stati fissati in formalina, processati ed esaminati istologicamente per valutare la presenza di eventuali lesioni.

### **3.6.2 IMMUNOISTOCHIMICA (IHC)**

Per le analisi di immunoistochimica (IHC) sono state effettuate 2 sezioni consecutive di 4 µm prelevate ogni 60 µm di spessore posizionate su vetrini portaoggetti Superfrost®. È stato utilizzato un immunocoloratore automatico BenchMark XT® (VentanaMedical System) che impiega per la rivelazione l'ultraView™ DAB (HRP) kit, un sistema biotina-free basato sull'utilizzo di un multimerico complessato all'enzima perossidasi Horseradish che

permette di identificare in modo sensibile gli anticorpi primari di topo e coniglio. Il kit è costituito da cinque componenti: ultraView™ Universal DAB Inhibitor (che impedisce un'aspecifica perossidazione della DAB), ultraView™ Universal DAB HRP Multimer (multimero biotina free complessato con la perossidasi Horse-raddish), ultraView™ Universal DAB Chromogen (diaminobenzidina), ultraView™ Universal DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ultraView™ Universal DAB Copper. Durante tutta la procedura i vetrini sono ricoperti da una soluzione oleosa per creare una camera umida sul tessuto; i reagenti sono stati distribuiti automaticamente, fatta eccezione per la titolazione dell'anticorpo primario che è stata effettuata manualmente (100 µl di soluzione con diluizione specifica a seconda del marcatore indagato). La controcolorazione è stata effettuata, sempre in modo automatizzato, con ematossilina di Mayer per 4 minuti. Al termine del protocollo, i vetrini sono stati accuratamente lavati in acqua e sapone per eliminare la soluzione oleosa e successivamente disidratati attraverso passaggi di due minuti ciascuno in soluzioni ascendenti di alcool (50%, 70%, 90%, 100) e in xilene; infine i vetrini sono stati montati con Eukitt® (Bio-Optica).

Gli anticorpi utilizzati, la loro diluizione e il controllo positivo sono stati:

- *mouse anti-human von Willebrand factor* – clone 21-43 (AbD Serotec, Kidlington, UK) – diluizione 1:50 – controllo positivo: endotelio della parete vascolare;
- *mouse anti-human α-smooth muscle actin* – clone HHF35 (AbD Serotec, Kidlington, UK) – diluizione 1:30 – controllo positivo: endotelio della parete vascolare;
- *mouse anti-human c-kit/CD117* – clone 104D2 (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) – diluizione 1:100 – controllo positivo: tessuto mammario umano.

Per tali analisi, gli anticorpi impiegati per le analisi di IHC, sono stati utilizzati in doppio associando gli anticorpi tra loro. Si sono inoltre ottenuti controlli negativi omettendo la

soluzione di anticorpo primario, sostituita da 100 µl del diluente utilizzato per gli anticorpi stessi (Antibody diluent, Ventana Medical System).

La valutazione della positività immunohistochimica per ciascuna lesione ischemica è stata effettuata al microscopio ottico mediante metodo semiquantitativo con valutazione della marcatura citoplasmatica.

### 3.6.3 IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

Per questo tipo di esame, sono state effettuate 2 sezioni di 3-4 µm ogni 50 µm di spessore che sono state incubate in buffer citrato, pH 6.0 in fornetto a microonde, 800W, per 20 minuti in accordo con i protocolli standard di smascheramento antigenico. Successivamente i preparati sono stati lavati con tampone fosfato (PBS) pH 7.15 ed incubati in siero equino (Novocastra, Leica MicroSystem S.r.l., Milano, Italy) per prevenire legami antigenici non specifici. Le sezioni sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi primari:

- *mouse anti-human mitochondrial* – clone MTC02 (Sigma Aldrich, United Kingdom);
- *mouse anti-human  $\alpha$ -smooth muscle actin* – clone CGA7 (Sigma Aldrich, United Kingdom).

Dopo lavaggio con PBS, i vetrini sono stati incubati per 30 minuti a temperatura ambiente con un *FITC-conjugated goat anti-mouse IgG* (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.) e con un *Texas red-conjugated goat anti-mouse IgG* (Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A.)

Come colorante nucleare è stato utilizzato il TO-PRO 3 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, California, U.S.A) incubandolo per 5 minuti a temperatura ambiente.

Le micro-fotografie sono state effettuate con un microscopio confocale a laser scanner TCS-SL (Leica, Wetzlar, Germany) utilizzando una lunghezza d'onda del filtro d'eccitazione di 488 nm per il FITC, di 543 nm per il Texas Red e di 633 nm per il TO-PRO 3.

#### **3.6.4 ELABORAZIONI STATISTICHE**

Per la valutazione dei dati categorici è stato utilizzato un test esatto di Fisher mentre per la comparazione dei dati quantitativi è stato utilizzato il test del t di Student o del  $\chi^2$ .

Il tempo è espresso come minuti.secondi  $\pm$  minuti.secondi e i risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard ( $M \pm ds$ ). Un valore di  $P < 0,05$  è stato considerato significativo.

Tutti i dati sono stati elaborati e comparati con MS Excel XLSTAT (Addinsoft, Paris, France).

## 4. RISULTATI

### 4.1 MODELLO CHIRURGICO-ANESTESIOLOGICO

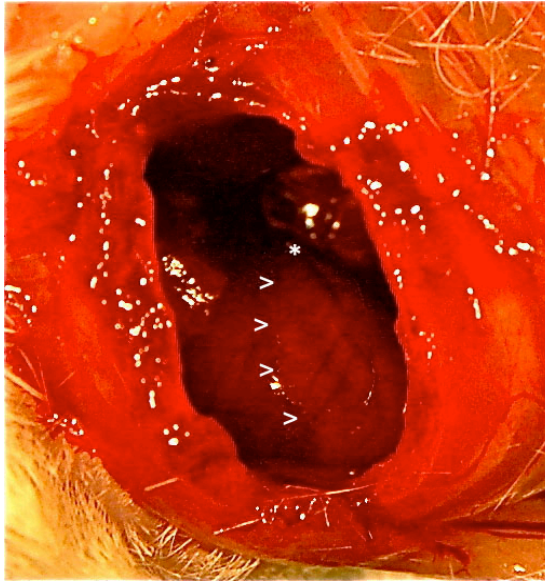
Per i risultati inerenti l'anestesia, si è osservata una sopravvivenza del 90% nella procedura di intubazione endotracheale (ET), con tempo di  $02.35 \pm 0.41$  (M  $\pm$  ds), del 100% in quella di tracheotomia (TT) con tempo di  $05.02 \pm 0.36$  (M  $\pm$  sd) e del 100% nei gruppi dei non intubati (NI).

L'infarto miocardico acuto è stato diagnosticato nel 100% dei cuori operati. Macroscopicamente l'IMA si è rilevato come un'area di forma irregolarmente triangolare, con apice a livello del punto di legatura dell'arteria coronaria LAD e base verso l'apice del cuore. Essa si presentava di colore più chiaro rispetto al tessuto vascolarizzato (Figura 4.1)

Il successo chirurgico generale è stato del 84,28% dei casi (134/159) avente come principale causa di insuccesso l'emorragia dell'arteria mammaria interna sinistra (16/25). Altre cause di morte sono state l'emorragia della parete ventricolare sinistra (5/25), edema della glottide in fase di intubazione (2/25), arresto respiratorio idiopatica in fase di risveglio (2/25): i risultati specifici per ogni Gruppo sono riportati nella Tabella 4.1.

In particolare, riferendosi al solo gruppo 2 (n. 60) in cui gli animali sono stati sottoposti alla sola procedura di legatura dell'arteria coronaria LAD ed in cui è stata valutata l'influenza della procedura anestesiologica e del posizionamento del paziente sull'*outcome* operatorio, il successo chirurgico medio di induzione di infarto miocardico acuto è stato dell'86,21% (50/58), con un successo dell'80,00% (24/30) nei gruppi LR e del 92,86% (26/28) nel gruppo SR. Le cause di morte sono state emorragia dell'arteria mammaria interna sinistra (n = 4), emorragia della parete ventricolare sinistra (n = 2), non risveglio





**Figura 4.1.** Topo, cuore. Quadro macroscopico dopo induzione di infarto miocardico acuto (20 minuti post-legatura coronarica). Vista intraoperatoria. Area più biancastra, con partenza dal nodo di sutura (asterisco) ed estensione a tutta la parete (frecche aperte: delimitazione del margine della lesione).

dall'anestesia senza evidenze mediche particolari (n = 2) nel gruppo SR. Nello specifico delle cause di morte all'interno dei gruppi, l'emorragia dell'arteria mammaria interna sinistra è avvenuta nel gruppo ET-LR = 1, nel TT-LR = 1 e nel NI-LR = 2 mentre l'emorragia della parete ventricolare sinistra nei gruppi NI-LR = 1 e ET-LR = 1. L'arresto respiratorio post-operatorio è avvenuto nei gruppi TT-SR = 1 e NI-SR = 1 senza evidenza all'esame necroscopico, come precedentemente accennato, di emorragia o altre complicazioni.

Per quanto riguarda la durata delle procedure chirurgiche, il tempo medio per le chirurgie effettuate in LR è stato di  $04.54 \pm 1.13$  (M  $\pm$  ds) mentre per quelle effettuate in decubito SR di  $01.43 \pm 0.42$  (M  $\pm$  ds). In Tabella 4.2 sono riportati, nello specifico, i dati inerenti questo gruppo. Brevemente, nel gruppo ET-LR il successo chirurgico è stato dell'80% (8/10) mentre nel gruppo ET-SR del 100% (8/8): il tempo di chirurgia medio è stato di  $06.01 \pm 0.28$  e  $02.25 \pm 0.34$  rispettivamente.

Nel gruppo TT il successo chirurgico è stato del 90% sia per il decubito LR che SR con durata media di  $05.09 \pm 0.39$  e  $01.42 \pm 0.32$  rispettivamente, mentre nel gruppo NI il successo chirurgico è stato del 70% nel decubito LR e del 90% in quello SR mentre la durata media degli interventi è stata di  $03.17 \pm 0.12$  e  $01.06 \pm 0.42$  rispettivamente.

**Tabella 4.1.** Outcome chirurgico per gruppo e per causa di decesso

Gruppo	Timing	Vivi	Deceduti				Totale
			EAM	EPV	EG	ARI	
<b>MSC + IMA</b>	24h	7	2	1	--	--	<b>10</b>
	48h	9	1	--	--	--	<b>10</b>
	72h	8	2	--	--	--	<b>10</b>
	1s	10	--	--	--	--	<b>10</b>
	2s	8	2	..	--	--	<b>10</b>
	4s	9	1	--	--	--	<b>10</b>
<b>IMA</b>	24h	7	2	--	1	--	<b>10</b>
	48h	9	--	1	--	--	<b>10</b>
	72h	8	2	--	--	--	<b>10</b>
	1s	7	1	1	--	1	<b>10</b>
	2s	9	1	--	--	--	<b>10</b>
	4s	8	--	--	1	1	<b>10</b>
<b>IMA + D-MEM</b>	24h	2	1	--	--	--	<b>3</b>
	72h	3	--	--	--	--	<b>3</b>
	2s	2	--	1	--	--	<b>3</b>
	4s	2	--	1	--	--	<b>3</b>
<b>MSC</b>	24h	4	1	--	--	--	<b>5</b>
	48h	5	--	--	--	--	<b>5</b>
	72h	5	--	--	--	--	<b>5</b>
<b>Controllo</b>	24h	3	--	--	--	--	<b>3</b>
	72h	3	--	--	--	--	<b>3</b>
	2s	3	--	--	--	--	<b>3</b>
	4s	3	--	--	--	--	<b>3</b>
<b>Totale</b>		<b>134</b>	<b>16</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>159</b>

Timing = tempo tra induzione IMA ed eutanasia; EAM = emorragia arteria mammaria interna di sinistra; EPV = emorragia parete ventricolare; EG = edema della glottide; ARI = arresto respiratorio improvviso in fase di risveglio; MSC = cellule staminali mesenchimali umane; IMA = infarto miocardico acuto; D-MEM = Dulbecco's modified Eagle Medium

**Tabella 4.2.** Sopravvivenza e durata media delle procedure chirurgico-anestesiologiche del gruppo con sola induzione dell'infarto miocardico acuto

	Con procedure anestetiche		Senza procedure anestetiche	Totale	Decubito chirurgico		
	ET	TT	NI		LR	SR	Totale
<b>Vivi</b>	18	20	20	58	24	26	<b>50</b>
<b>Deceduti</b>	2	0	0	2	6	2	<b>8</b>
<b>Totale</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>60</b>	<b>30</b>	<b>28</b>	<b>58<sup>a</sup></b>
<b>Tempo (M ± ds)</b>	02.35 ± 0.41	05.02 ± 0.36	00.00 ± 0.00		04.54 ± 01.13	01.43 ± 0.42	

	Gruppi chirurgici						Totale
	ET		TT		NI		
	LR	SR	LR	SR	LR	SR	
<b>Vivi</b>	8	8	9	9	7	9	<b>50</b>
<b>Deceduti</b>	2	0	1	1	3	1	<b>8</b>
<b>Totale</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>58</b>
<b>Tempo (M ± ds)</b>	06.01 ± 0.28	02.25 ± 0.34	05.09 ± 0.39	01.42 ± 0.32	03.17 ± 0.12	01.06 ± 0.42	

ET = intubazione endotracheale; TT = intubazione con tracheotomia; NI = non intubati; LR = decubito laterale destro; SR = decubito in posizione supina; M = media; ds = deviazione standard

a = 2 animali sono deceduti durante le procedure di intubazione e non sono entrati a far parte dei gruppi chirurgici

## 4.2 ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DELLE BM-MSCs

Per quanto riguarda i risultati inerenti l'isolamento e la caratterizzazione delle BM-MSCs, sono state riscontrate, dopo circa 10 giorni di incubazione, colonie con cellule di aspetto fibroblastoide che sono state tripsinizzate per l'espansione a 2000 cellule/cm<sup>2</sup>.

Successivamente, le BM-MSCs hanno subito 3 passaggi di espansione mantenendo l'aspetto fibroblastoide e andando incontro ad una crescita esponenziale: questo processo ha permesso di incrementare il loro numero di circa 200 volte rispetto al numero di partenza. Di queste, l'80% sono state congelate e il 20% sono state utilizzate per le prove funzionali di fenotipizzazione e di immunomodulazione.

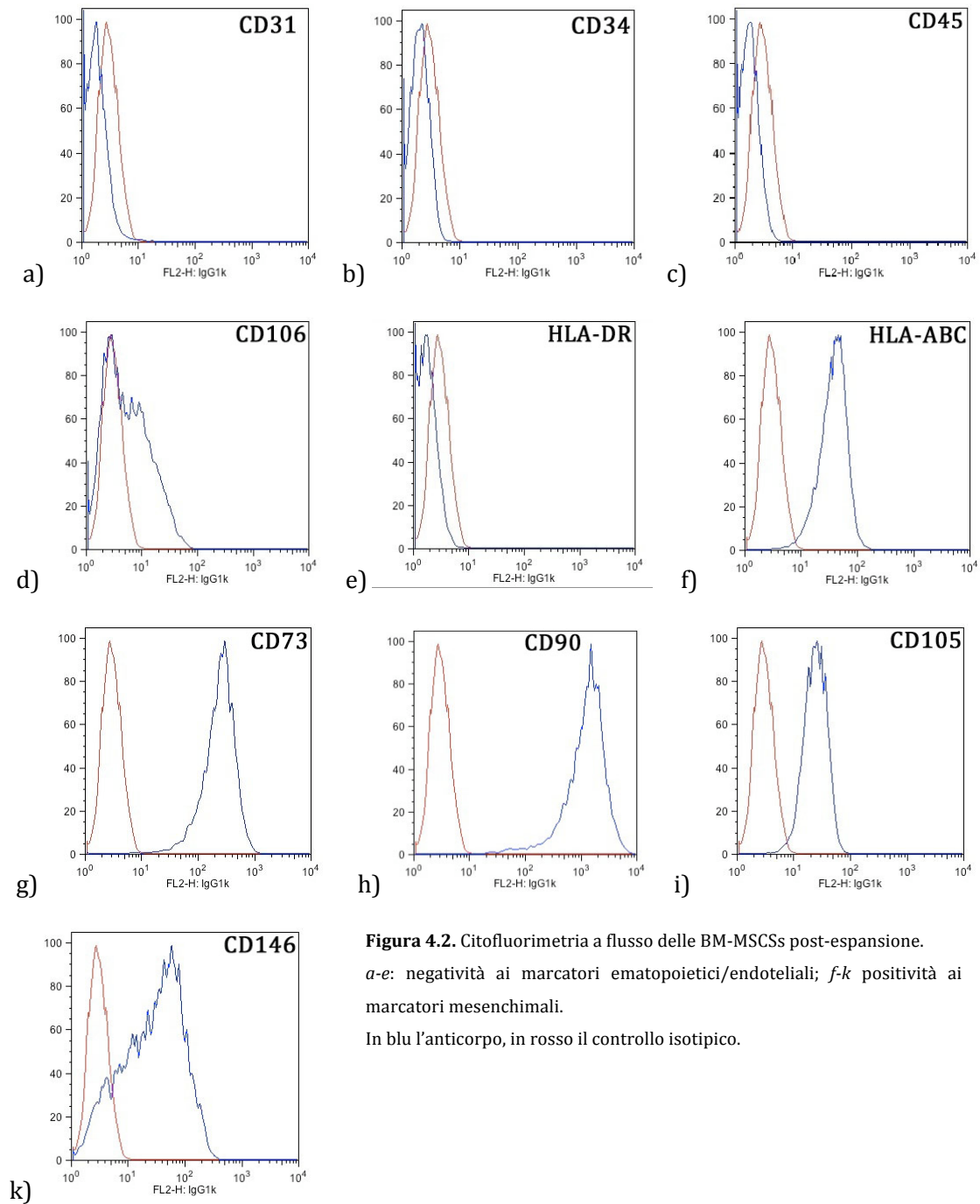
Nella fase post-prelievo, tutte le cellule isolate ed espanse sono risultate negative, all'esame citofluorimetrico, per i marcatori ematopoietici/endoteliali (CD31, CD34, CD45, CD106 e HLA-DR) e positivi per quelli mesenchimali (CD73, CD90, CD105, CD146 e HLA-ABC) come mostrato in Figura 4.2. Questi dati dimostrano che il campione non è stato contaminato da cellule di derivazione ematopoietica (CD45<sup>+</sup>), da cellule staminali ematopoietiche (CD34<sup>+</sup>) e/o da cellule di derivazione monocitica (CD14<sup>+</sup>).

#### **4.2.1 IMMUNOMODULAZIONE E DIFFERENZIAMENTO**

Le cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BM-MSCs) messe in co-coltura con PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) alla diluzione di 5:1 (PBMC : MSC) hanno mostrato un forte effetto immunosoppressore (Figura 4.3). Si denota, infatti, che la proliferazione dei PBMC è diminuita di oltre l'80% in rapporto alla proliferazione delle sole PBMC: tale proliferazione è stata invece aumentata in concentrazioni di 50:1 (PBMC : MSC).

Tali cellule hanno inoltre dimostrato la capacità di differenziare *in vitro* nelle 3 linee principali osteocitica, condrocitica e adipocitica (Figura 4.4): questi risultati hanno permesso di avere la certezza scientifica di avere a disposizione delle BM-MSCs non differenziate.

Successivamente, dopo scongelamento per l'utilizzo *in vivo*, le cellule hanno mantenuto il fenotipo sia nella fase pre- che post-transfezione con il trans-attivatore di trascrizione (TAT).



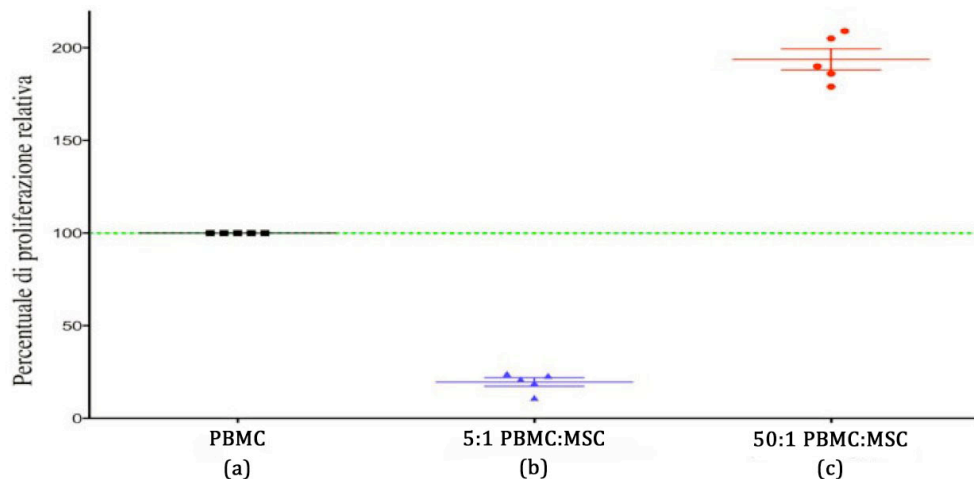
**Figura 4.2.** Citofluorimetria a flusso delle BM-MSCs post-espansione.

*a-e*: negatività ai marcatori ematopoietici/endoteliali; *f-k* positività ai marcatori mesenchimali.

In blu l'anticorpo, in rosso il controllo isotipico.

Tale risultato ha confermato il fenotipo mesenchimale, con una positività all'espressione dei marcatori mesenchimali (CD73, CD105 e HLA-ABC) e la negatività a quelli ematopoietici/endoteliali (CD40, CD54, CD80, CD86, CD106 e HLA-DR) come mostrato in **Figura 4.5**.

Questi risultati dimostrano che le cellule BM-MSCs TAT-GFP<sup>+</sup> pronte al trapianto erano BM-MSC GFP<sup>+</sup> indifferenziate.



**Figura 4.3.** Effetti immunomodulanti delle BM-MSCs. a): proliferazione relativa di sole PBMC coltivate; b) effetto immunosoppressore sulla proliferazione delle PBMC da parte delle BM\_MSCs al rapporto di 5:1; c) effetto immunostimolante sulla proliferazione di PBMC da parte delle BM-MSCs al rapporto di 50:1.

PBMC = peripheral blood mononuclear cells; MSC = cellule staminali mesenchimali

### 4.3 TRANSFEZIONE CON TAT-GFP<sup>+</sup>

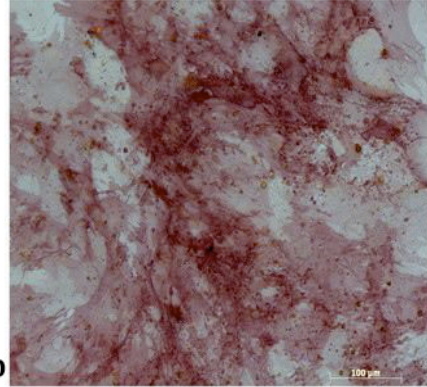
Per quanto concerne i risultati citofluorometrici di positività alla GFP delle cellule transfettate con TAT-GFP<sup>+</sup> con la tecnica descritta nel paragrafo 3.5.3, le BM-MSCs GFP<sup>+</sup> sono risultate positive con una purezza media del  $94,88 \pm 5,14$  (M  $\pm$  ds). Per i risultati riferiti ad ogni singola marcatura, si rimanda alla Tabella 4.3.

Medium controllo



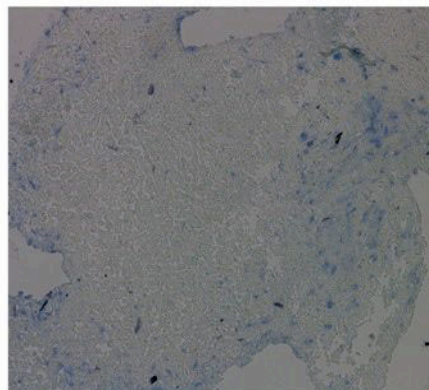
a)

Medium osteogenico



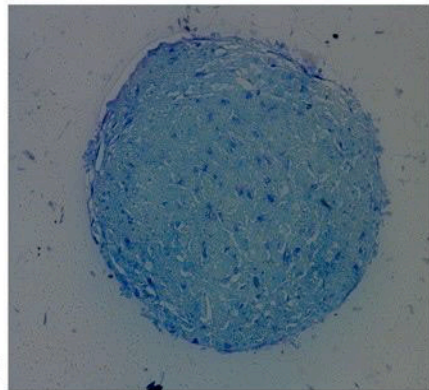
(b)

Medium controllo



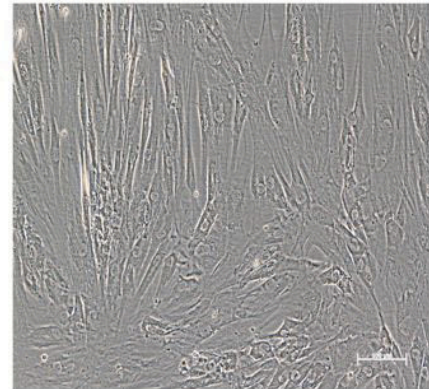
c)

Medium condrogenico



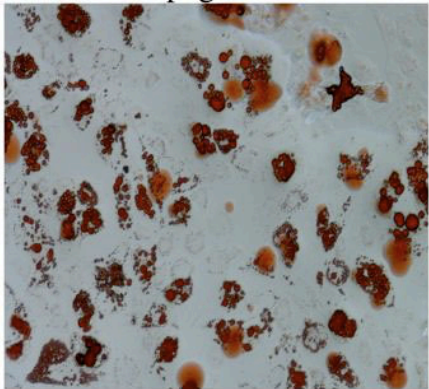
(d)

Medium controllo



e)

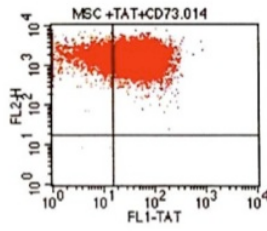
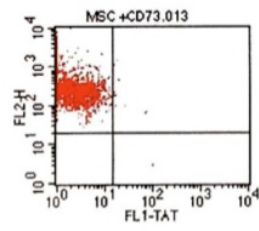
Medium adipogenico



(f)

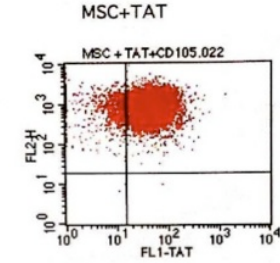
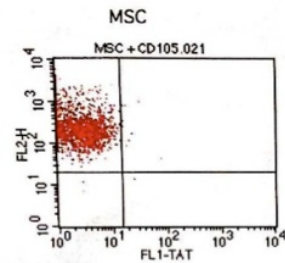
**Figura 4.4.** Differenziamento verso le linee osteogenica (a-b), condrogenica (c-d) e adipogenica (e-f).

(a-b) controllo negativo del terreno osteogenico (a) e positività della coltura (b) per colorazione dei depositi di calcio prodotti dalle cellule, colorazione ALP, immunostochimica, 20x; (c-d) controllo negativo del terreno condrogenico (c) e positività della coltura (d) per colorazione dei proteoglicani e degli glicosamminoglicani, colorazione blu di toluidina, istochimica, 10x; (e-f) controllo negativo del terreno adipogenico (e) e positività della coltura (f) per colorazione dei depositi adipocitari, colorazione Oil-Red-O, istochimica, 40x



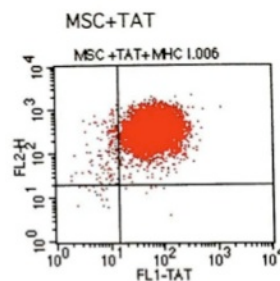
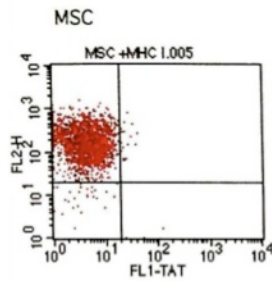
ANTI CD 73

a)



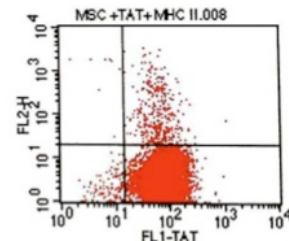
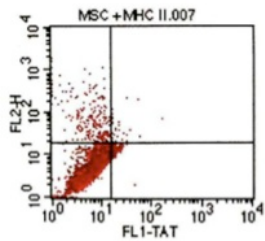
ANTI CD 105

b)



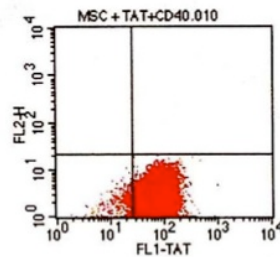
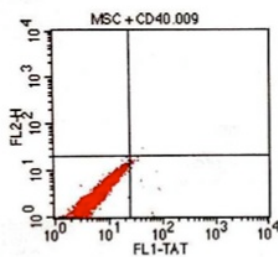
ANTI HLA ABC

c)



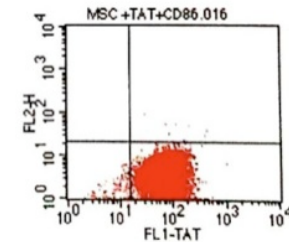
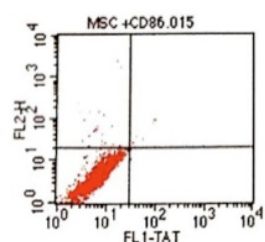
ANTI HLA DR

d)



ANTI CD 40

e)



ANTI CD 86

f)

**Figura 4.5.** Citofluorimetria a flusso in singolo pre- (a sinistra) e in doppio post- (a destra) transfezione con TAT-GFP.

Positività del cursore negli istogrammi < 2%.

*a-c:* positività ai marcatori mesenchimali e alla GFP;

*d-f:* negatività ai marcatori ematopoietici/endoteliali e positività alla GFP.



**Tabella 4.3.** Citofluorimetrie a flusso delle BM-MSc post-transfezione con TAT-GFP

Anticorpo	% di cellule positive				Totale
	Ac- / GFP -	Ac+ / GFP-	Ac- / GFP+	Ac+ / GFP+	
<b>CD73</b>	0,03	15,24	0,00	84,73	100,00
<b>CD105</b>	0,01	4,82	0,01	95,16	100,00
<b>HLA-ABC</b>	0,24	2,22	0,09	97,45	100,00
<b>CD40</b>	4,51	0,00	95,48	0,01	100,00
<b>CD86</b>	1,78	0,00	97,96	0,26	100,00
<b>HLA-DR</b>	1,75	0,12	92,47	5,66	100,00

	Ac+	Ac-	GFP+	GFP-
<b>CD73</b>	99,97	0,03	84,73	15,27
<b>CD105</b>	99,98	0,02	95,17	4,83
<b>HLA-ABC</b>	99,67	0,33	97,54	2,46
<b>CD40</b>	0,01	99,99	95,49	4,51
<b>CD86</b>	0,26	99,74	98,22	1,78
<b>HLA-DR</b>	5,78	94,22	98,13	1,87
<b>MEDIA</b>			94,88	5,12
<b>DS</b>			5,14	5,14

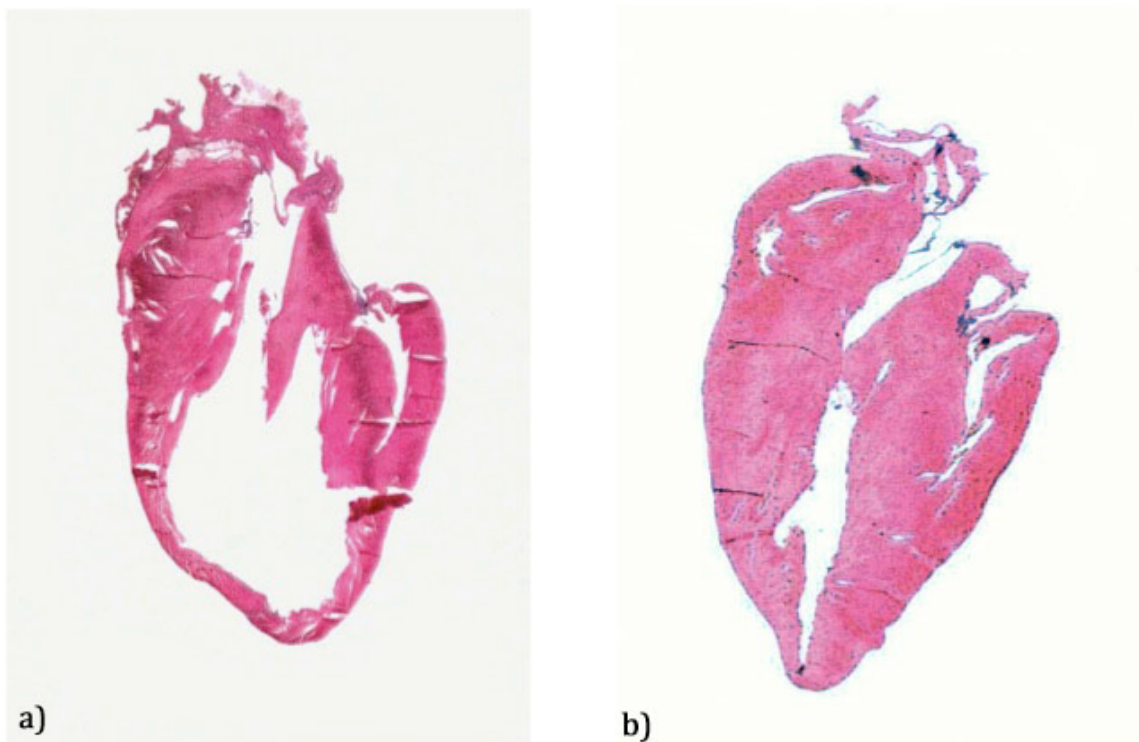
AC+ = positività al corrispondente anticorpo della prima colonna; AC- = negatività al corrispondente anticorpo della prima colonna; GFP+ = positività alla GFP; GFP- = negatività alla GFP; DS = deviazione standard

#### 4.4 STUDI ISTOPATOLOGICI

Per gli studi istopatologici, riferibili all'istologia standard, all'immunoistochimica (IHC) e alla immunofluorescenza (IF), sono state esaminati 134 cuori: nello specifico, 109 cuori dei gruppi che hanno subito la procedura di induzione dell'infarto miocardico acuto (IMA) e 25 ai gruppi di sola iniezione delle BM-MSCs GFP+ e di controllo. I cuori sono stati randomizzati

in due gruppi, ed è stata effettuata in 54 cuori la sezione longitudinale, e in 55 la sezione trasversale.

In 86 cuori su 109 appartenenti ai gruppi sottoposti a legatura dell'arteria coronaria LAD, è stato possibile riconoscere macroscopicamente gli esiti di IMA osservato come assottigliamento della parete libera ventricolare sinistra con iniziale dilatazione della camera ventricolare (figura 4.6).



**Figura 4.6.** Topo, cuore, sezione longitudinale, *a)* 2 settimane post-IMA e *b)* nel gruppo di controllo.

In *a)* si denoti il marcato assottigliamento della parete libera ventricolare sinistra con dilatazione camerale, EE, 4x

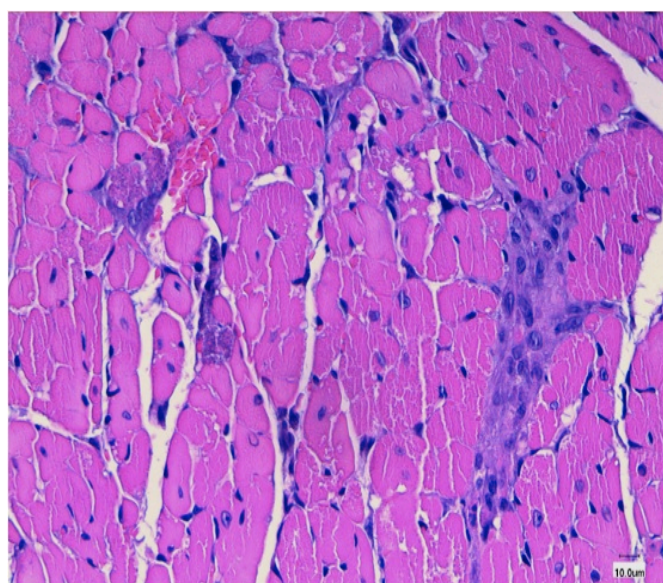
#### **4.4.1 ISTOLOGIA STANDARD**

Nelle sezioni colorate con ematossilina-eosina (EE), nei preparati a sezione trasversale a 24, 48 e 72h di 55 cuori, si sono osservate lesioni progressive riferibili ad estese aree di degenerazione focale e necrosi a livello della parete ventricolare sinistra: tali lesioni si sono presentate con un'estensione che partiva dall'epicardio e proseguiva verso i muscoli

papillari. Si è inoltre osservato che quest'area si è lievemente e diffusamente assottigliata rispetto ai cuori di controllo (Figura 4.6). All'interno dell'area patologica, le miofibre si sono presentate con forma irregolare, con segni di frammentazione e vacuolizzazione del sarcoplasma e margini poco definiti. Multifocalmente, piccole porzioni di fibre muscolari sono apparse ipereosinofile e associate a mineralizzazioni distrofiche disseminate. Frequentemente inoltre, si sono osservati i nuclei delle miofibre picnotici o carioretici. In ultimo si è rilevato un moderato infiltrato infiammatorio caratterizzato da rari neutrofilii, macrofagi e occasionali linfociti (figura 4.7); la gravità della lesione e dell'infiltrato infiammatorio è stata maggiore nella regione esterna miocardica-pericardica.

A 2 e 4 settimane post-operatorie, sono state riscontrate lesioni distribuite similmente caratterizzate da un grave infiltrato infiammatorio composto da macrofagi e un aumentato numero di linfociti e plasmacellule.

In aggiunta si è evidenziata una diffusa popolazione di aspetto fusato-ovalare diffusamente intensa, associata a matrice fibrillare eosinofila, riferibile a fibrosi, come confermato dalla colorazione tricromica di Masson.



**Figura 4.7.** Topo, cuore, 48h post-infarto miocardico acuto. Si noti la vacuolizzazione sarcoplasmatica e la ialinosi con irregolarità dimensionale, arrotondamento e iniziale picnosi e perdita del profilo nucleare. Sono presenti aree riferibili a mineralizzazione sarcoplasmatica (freccia).

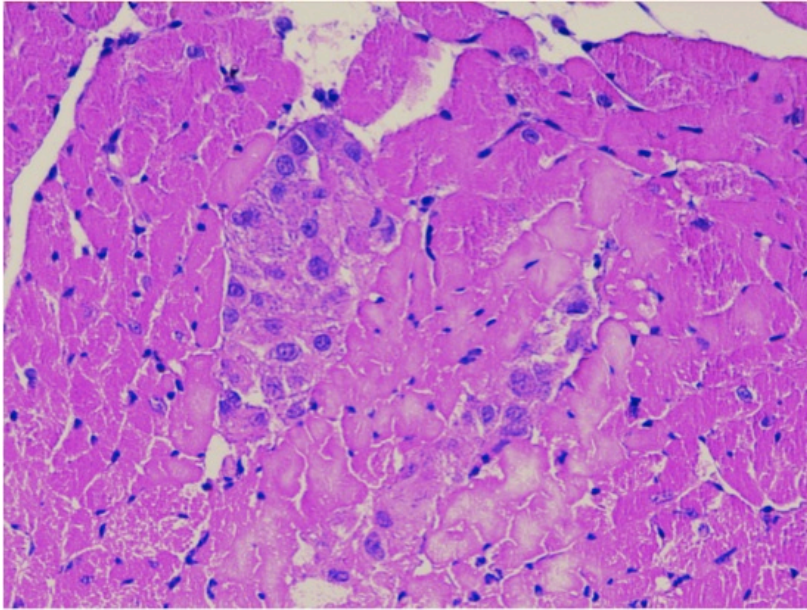
Nei gruppi di controllo non sono state osservate lesioni significative.

Nei preparati dei 54 cuori in sezione longitudinale, le lesioni osservate sono state molto simili con estensione a triangolo, con apice a livello della legatura dell'arteria coronaria LAD e base verso l'apice cardiaco.

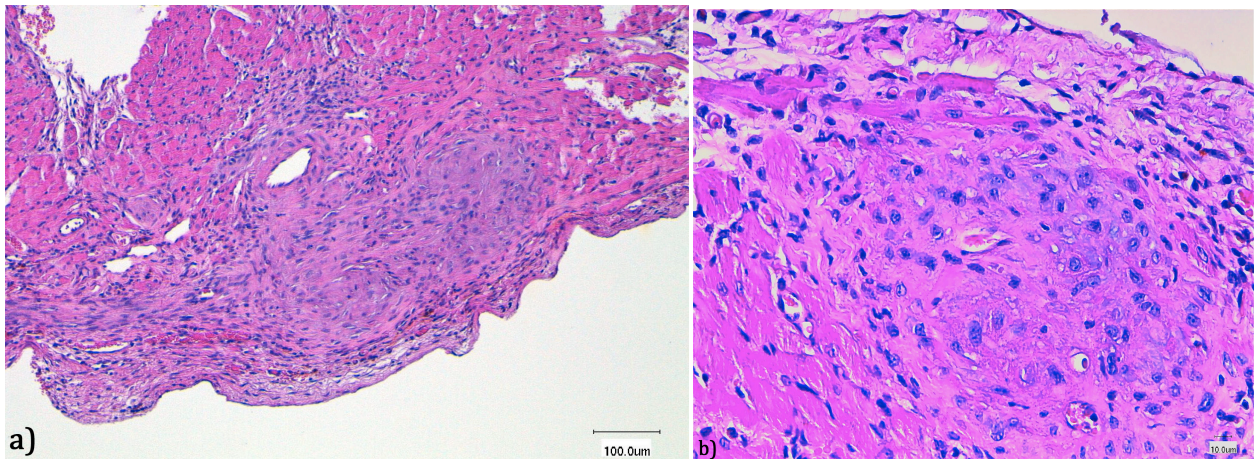
In aggiunta alle lesioni appena descritte, si sono rilevati inoltre, nel 13,85% dei casi (9/65), e specificatamente nei gruppi a 24h (n = 5), a 48h (n = 2), a 1 settimana (n = 1) e a 2 settimane (n = 1), cluster di cellule non immediatamente riconducibili ai miocardiociti. Tali campioni appartenevano esclusivamente a gruppi di topi che hanno subito il trapianto di BM-MSCs con o senza induzione di IMA (gruppo 1 e gruppo 3, rispettivamente). In particolare, 7 animali erano inseriti nel gruppo 1 (3 a 24h, 1 a 48h, 1 ad una settimana e 1 a due settimane) e 2 al gruppo 3 (1 a 24h e 1 a 48h).

Le cellule evidenziate, nei gruppi a 24 e 48h, sono apparse disseminate in piccoli gruppi di circa 5-15 elementi all'interno della lesione infartuale tra le fibre miocardiche. Presentavano un aspetto ovalare, irregolare, a margini non ben definiti con citoplasma abbondante eosinofilo, finemente granulare e nuclei rotondeggianti paracentrali a cromatina punteggiata e nucleolo singolo (figura 4.8). Tali cluster sono stati riscontrati in corrispondenza della sede di inoculo delle BM-MSC TAT-GFP<sup>+</sup>. Nei gruppi a 2 settimane, all'interno della lesione, che mostrava un aspetto maggiormente fibrosante come precedentemente descritto, si sono evidenziati elementi ovalari, globosi non immediatamente riconducibili a fibroblasti reattivi, a margini scarsamente definiti, citoplasma eosinofilo lievemente fibrillare, e nuclei ovalari, (Figura 4.9a). Tali elementi, organizzati ad andamento lievemente concentrico in piccole aree multifocali, sono risultati associati a scarsa matrice extracellulare eosinofila fibrillare (Figura 4.9b).

Tutti gli altri organi esaminati – polmoni, fegato, milza, rene sinistro, rene destro, pancreas, stomaco, duodeno, ileo, colon e vescica – non hanno presentato lesioni significative. all'esame istologico.



**Figura 4.8.** Topo, cuore, 24h post-infarto miocardico acuto. Presenza di iniziali quadri istolesivi nelle fibre miocardiche e gruppi di cellule ovalari, irregolari, a moderato citoplasma eosinofilo, a margini non ben definiti, EE, 40x

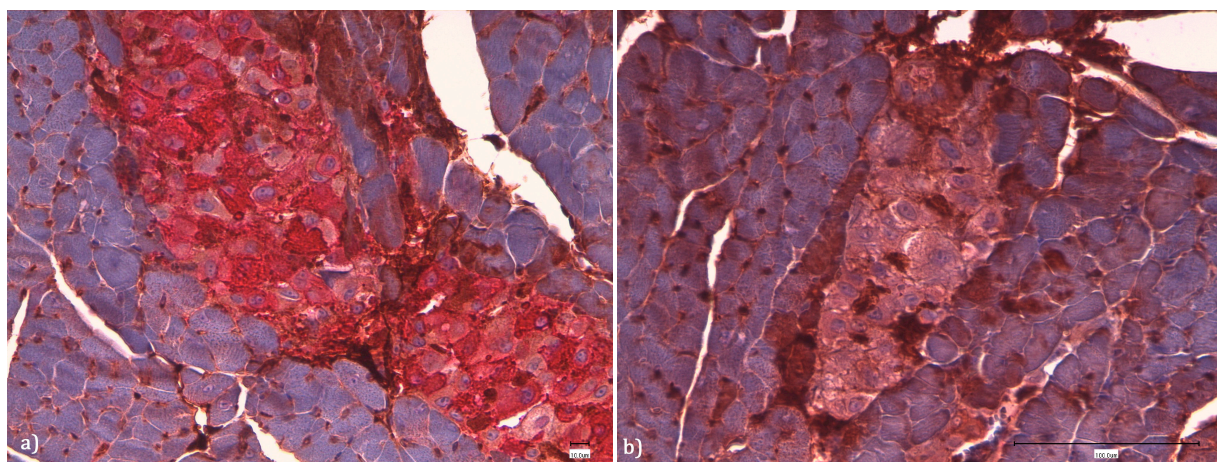


**Figura 4.9.** Topo, cuore, 2 settimane post-infarto miocardico acuto. a) area miocardica fibrotica con orientamento irregolarmente concentrico multifocale degli elementi cellulari, EE, 10x. b) nelle aree con andamento più circolare sono evidenti elementi globosi - ovalari a scarso citoplasma, non ben definibili, immersi in scarsa matrice, EE, 40x (particolare di a)

#### 4.4.2 IMMUNOISTOCHEMICA (IHC)

Per quanto riguarda le analisi di immunoistochimica in doppio, queste hanno dato risultati simili su tutti i cuori analizzati ai diversi tempi di eutanasia. In particolare, nei cuori trapiantati con BM-MSCs in cui si sono evidenziati i cluster di cellule atipiche, queste

hanno mostrato una specifica co-marcatura con gli anticorpi *anti-human von Willebrand factor* e *anti-human  $\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA); sono, invece, risultate negative per *anti-human c-kit/CD117*. La co-marcatura rilevata nelle cellule descritte non è stata osservata in nessun altro elemento cellulare dei tessuti analizzati (Figura 4.10). Gli anticorpi *anti-human von Willebrand factor* e *anti-human  $\alpha$ -smooth muscle actin* hanno mostrato cross-reattività con antigeni interni al tessuto quali endotelio e parete vascolare rispettivamente. L'anticorpo *anti-human c-kit/CD117* non ha dato, invece, alcuna positività nei campioni esaminati, e il controllo positivo (tessuto mammario umano) ha dato la positività duttale attesa. I controlli negativi (omissione dell'anticorpo primario) non hanno mostrato alcuna positività aspecifica.

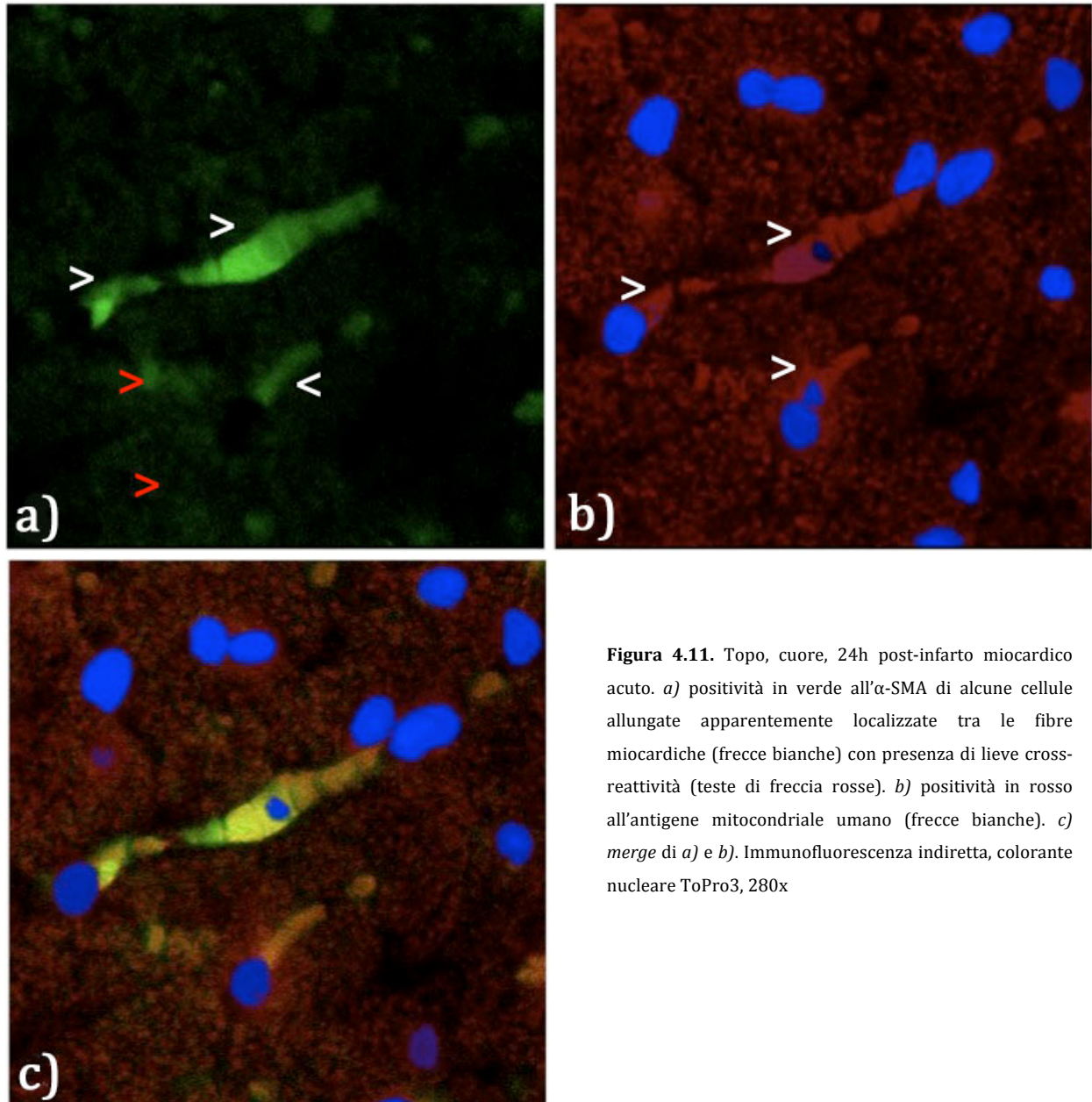


**Figura 4.10.** Topo, cuore, 48h post-infarto miocardico acuto. *a)* positività citoplasmatica dei gruppi cellulari evidenziati in EE (figura 4.8) sia al von Willebrand factor (colorazione in rosso) sia alla  $\alpha$ -SMA (colorazione in marrone). Immunoistochimica in doppio, contro colorazione: ematossilina, 40x. *b)* negatività citoplasmatica delle stesse cellule al c-kit/CD117 (colorazione in rosso) e positività al von Willebrand factor (colorazione in marrone). Immunoistochimica in doppio, contro colorazione: ematossilina, 40x

#### 4.4.3 IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

L'ottimizzazione del protocollo di IF si è rilevata particolarmente complessa a causa della forte e ben nota autofluorescenza del tessuto miocardico. Questo ha determinato la necessità di un accurato settaggio dei filtri al fine di confermare positività specifiche ed

eliminare segnali di fondo. In seguito a tale ottimizzazione, particolarmente necessaria per l'individuazione del segnale GFP, si sono riscontrati segnali positivi in uno scarso numero di campioni.



**Figura 4.11.** Topo, cuore, 24h post-infarto miocardico acuto. *a)* positività in verde all' $\alpha$ -SMA di alcune cellule allungate apparentemente localizzate tra le fibre miocardiche (freccie bianche) con presenza di lieve cross-reattività (teste di freccia rosse). *b)* positività in rosso all'antigene mitocondriale umano (freccie bianche). *c)* merge di *a)* e *b)*. Immunofluorescenza indiretta, colorante nucleare ToPro3, 280x

Nello specifico, sono state cercate le positività per GFP (cellule BM-MSCs marcate con TAT-GFP), per l' $\alpha$ -SMA (green) e per l'antigene mitocondriale umano (red). In particolare, si è osservata la positività a 24h all'anticorpo mitocondriale umano (figura 4.11) e

all'anticorpo  $\alpha$ -SMA in 2 casi (2/65 - 3,08%). Tali positività hanno mostrato una co-localizzazione solo a carico di alcune rare cellule di aspetto allungato, localizzate tra le fibre miocardiche e presenti nei 2 casi rappresentati da topi trapiantati con BM-MSCs appartenenti al gruppo 1 (IMA con trapianto di BM-MSCs GFP+).

Si è evidenziata una cross-reattività antigenica minima per alcune strutture vascolari positive all'anti-human  $\alpha$ -SMA mentre, per quanto riguarda la positività alla GFP, questa ha dato risultati esigui in tutti i campioni.

#### **4.5 ANALISI STATISTICA**

Attraverso l'utilizzo del test del t di Student, è stata osservata una differenza statistica significativa ( $p < 0,01$ ) tra i gruppi per quanto riguarda la durata media delle procedure operatorie, intese come la somma delle procedure anestesologiche e chirurgiche. Nello specifico, la differenza risultata è la seguente: ET < TT, SR < LR, ET-SR < ET-LR, TT-SR < TT-LR, NI-SR < NI-LR.

Inoltre, attraverso l'utilizzo del  $\chi^2$ , è stata osservata una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) per quanto riguarda la sensibilità diagnostica di rivelazione di BM-MSCs GFP+ dell'IHC in confronto all'IF.





## 4. DISCUSSIONE

L'infarto miocardico acuto (AMI) nell'uomo, permane tuttora la prima causa di morte singola in Europa e nel mondo, con un significativo aumento del tasso di mortalità nei Paesi dell'Est Europa dovuto, probabilmente, all'aumento dell'uso e dell'abuso di alcool e tabacco specialmente nelle donne. L'AMI, di conseguenza, presenta una alta incidenza nei costi economici e sociali: dei costi globali sostenuti in Europa per le cure derivanti dall'AMI – circa 49 miliardi di Euro nel 2008 – approssimativamente il 48% è imputabile ai costi sanitari diretti, il 34% alla perdita di produttività e il 18% al mantenimento delle cure (Allender S. *et al.*, 2008).

Grazie alla piccola taglia ed alla sua relativa semplicità di gestione, il modello animale divenuto uno dei più utilizzati come modello per l'AMI umano è il topo. Questo modello richiede, comunque, la necessità di dispendiosi macchinari ventilatori appositamente progettati per animali dal peso medio di 25-30 gr. circa con minimi volumi tidalici ed alta frequenza respiratoria (Kumashiro H. *et al.*, 1999). In questo progetto sono stati valutati metodi alternativi di protocolli e tecniche chirurgico-anestesiologiche per incrementare la possibilità di utilizzo di questo modello anche da parte di laboratori che non sono in grado di usufruire di tale strumentazione.

Per quanto concerne l'anestesia, l'intubazione endotracheale (ET) nei roditori è una tecnica ben descritta (Deyo D.J. *et al.*, 1999; Rivera B. *et al.*, 2005), tuttavia la glottide e la laringe del topo sono molto sensibili ai tentativi di intubazione e l'edema presenta una insorgenza iper-acuta (Vergari A. *et al.*, 2003). Inoltre, i topi transgenici risultano essere particolarmente dispendiosi e la perdita di un animale durante le difficili procedure pre-anestetiche conduce il ricercatore verso un senso di frustrazione che può ripercuotersi in

senso negativo sulle procedure che il ricercatore dovrà svolgere (Vergari A. *et al.*, 2004). Al contrario, l'intubazione per tracheotomia (TT) non presenta effetti sulla sopravvivenza alle manovre di intubazione, ma è considerata una procedura invasiva che, mentre da un lato presenta maggiori rischi per complicazioni fatali come la stenosi tracheale (Halum S.L. *et al.*, 2012), dall'altro aumenta drammaticamente la quantità di tempo totale necessaria alla sua ultimazione.

In accordo con la letteratura, i topi in stato di ipossia hanno la possibilità di auto-rianimarsi attraverso quello che viene definito come "gasping" (Gershan W.M. *et al.*, 1992). In questo progetto è stato ipotizzato che una chirurgia a torace aperto di breve durata avrebbe potuto essere eseguita senza aiuti respiratori esterni. I risultati ottenuti hanno mostrato come le procedure di intubazione (sia ET che TT) non hanno condotto ad un aumento del successo chirurgico ma solo ad un significativo aumento della durata delle procedure di induzione di AMI se confrontati con i risultati ottenuti nel gruppo NI.

Un'altra interessante variabile molto studiata e che sta crescendo di interesse in differenti branche della medicina umana, è l'influenza della posizione del paziente sull'esito delle procedure chirurgiche (Ledwith M.B. *et al.*, 2010; Lan C.C. *et al.*, 2010; Aries M.J. *et al.*, 2010; Lan C.C. *et al.*, 2011). Nakao e collaboratori hanno dimostrato nei cani e nei maiali che la posizione del corpo influisce significativamente sulla gittata cardiaca, che aumenta nella LR in confronto con SR, sulla saturazione artero-venosa di ossigeno, diminuita nella LR in confronto alla SR e sulla pressione dei due ventricoli, aumentata nella LR in confronto alla SR (Nakao S. *et al.*, 1986). Basandosi su queste osservazioni, il nostro lavoro ha investigato l'effetto del decubito degli animali in rapporto al successo operatorio nel modello di AMI nel topo. Il risultato emerso ha mostrato una maggior mortalità nella LR in confronto alla SR, anche se tale differenza non è risultata statisticamente significativa (successo del 80% e

92,86% rispettivamente). In riferimento alla maggior causa di mortalità nei gruppi – l'emorragia dell'arteria mammaria interna sinistra – il decubito del paziente può essere considerato un fattore importante: nella LR il cuore si appoggia al polmone destro poco ventilato, mentre il polmone sinistro, ben ventilato, oltre a coprire parzialmente l'area cardiaca, provoca una leggera rotazione del cuore portando l'arteria coronaria LAD più cranialmente se confrontata con la SR. Di conseguenza, per identificare e raggiungere l'arteria coronaria LAD per la sua legatura, a volte si è reso necessario un prolungamento verso lo sterno della breccia toracotomia aumentando drasticamente le probabilità di sezione dell'arteria mammaria suddetta. Al contrario, nella SR, il cuore ruota lievemente verso l'esterno e i movimenti respiratori del polmone sinistro non vanno a coprire l'area cardiaca permettendo una più semplice e rapida individuazione dell'arteria coronaria LAD permettendo una sua rapida legatura e diminuendo il rischio di emorragia. In aggiunta, la differente rotazione del cuore (LR versus SR), interessa anche la durata della chirurgia che risulta essere inevitabilmente e significativamente più lunga nella LR rispetto alla SR. Inoltre, per chiudere il torace, sono stati utilizzati 1 punto di sutura singolo per la SR e 2 per la LR, prolungando ulteriormente la durata della chirurgia.

In 2 casi si è osservata la morte improvvisa in fase di risveglio senza alcun segno clinico né anatomico-patologico di un processo in atto. Durante le fasi di questo progetto si è potuta osservare una maggior sensibilità dei topi Balb/c Athymic Nude-Fox1<sup>nu</sup> alla classica anestesia iniettiva e si è, pertanto, ipotizzato che la morte per arresto respiratorio possa essere dovuta ad una maggior sensibilità ai farmaci anestetici in questi 2 soggetti rispetto al resto della popolazione.

La ricerca medica traslazionale, da sempre metodo di importanza fondamentale per garantire una accurata metodologia e una sicurezza nella ricerca clinica, ha subito negli

ultimi decenni un profondo cambiamento dovuto allo svilupparsi, nella sensibilità umana e scientifica, di una coscienza bioetica particolarmente profonda (Stryker J., 1984; Bulger R.E., 1987). Nel 1992 Russel e collaboratori hanno pubblicato un manuale in cui sono stati definiti gli iniziali lavori di pensiero di quelli che sarebbero successivamente diventati *I Principi delle 3R: Replacement, Reduction e Refinement* (Russell, W.M.S. & Burch, R.L., 1992), principi oramai divenuti fondamentali per la ricerca scientifica pre-clinica (Farnaud S., 2009).

*I Principi delle 3R* possono essere definite come:

- Replacement: metodi con i quali si evitano o si sostituiscono gli animali nella ricerca che potrebbe causare loro dolore;
- Reduction: metodi con i quali si minimizza l'uso di animali consentendo al ricercatore di ottenere lo stesso livello di informazioni da meno animali o di ottenere una maggior quantità di informazioni dallo stesso numero di animali diminuendo, di conseguenza, il loro uso in eventuali studi futuri;
- Refinement: miglioramento delle procedure e delle manipolazioni atte a minimizzare il dolore presente o potenziale, lo stress, la sofferenza o il procurato dolore o, in alternativa, migliorare il benessere animale in quelle situazioni in cui il loro utilizzo non può essere vietato (NC3Rs/BBSRC/Defra/MRC/NERC/Wellcome Trust, 2008).

In letteratura la bibliografia concernente l'induzione di IMA nel topo senza intubazione è molto scarsa (Gao E. *et al.*, 2010): i risultati ottenuti in questo progetto confermano quanto descritto, permettendo una riduzione della mortalità, un aumento della velocità di induzione di IMA diminuendo, di conseguenza, le probabilità di danni tissutali più estesi e

riducendo l'invasività dell'intervento. Tutte queste conclusioni si sposano in particolar modo con il *Refinement* precedentemente descritto consentendo, anche una riduzione del numero di animali utilizzati.

Dopo la scoperta, negli anni '90, che il cuore è un organo capace di rigenerare nuovi miocardiociti (Olivetti G. *et al.*, 1997; Anversa P. *et al.*, 1998; Kajstura J. *et al.*, 1998) e dotato di alta plasticità (Kajstura J. *et al.*, 2012), molta attenzione è stata posta alla ricerca sull'uso di molteplici tipi di cellule staminali per favorire ed aumentare la quantità e la capacità di rigenerazione di miocardiociti *ex novo* (Anversa P. *et al.*, 2013). Numerosi lavori hanno investigato quale potrebbe essere la miglior cellula staminale da utilizzare (Reinecke H. *et al.*, 2002; Hagège A.A. *et al.*, 2006; Zwi-Dantsis L. & Gepstein L., 2012), quale la miglior via di trapianto (Kang H.J. *et al.*, 2004; Siminiak T. *et al.*, 2005; Perin E.C. *et al.*, 2006; Kurpisz M. *et al.*, 2007; Hamdi H. *et al.*, 2011) e quale il miglior momento in cui iniziare la terapia staminale (Zhang S. *et al.*, 2009; Zhang Y. *et al.*, 2011), ma ognuna delle soluzioni proposte presenta vantaggi e svantaggi. Dopo la scoperta che le cellule staminali cardiache residenti (CSCs) sono multipotenti e in grado di rigenerare miocardiociti *ex novo* (Beltrami A.P. *et al.*, 2003), molta attenzione è stata posta, oltre alla loro espansione ed utilizzo *in vivo* (Barile L. *et al.*, 2007), anche alle indagini per valutare l'aumento dell'efficacia rigenerativa delle CSCs attraverso l'uso di citochine fisiologicamente prodotte dall'organo post-infartuato (Wen Z. *et al.*, 2012).

I risultati in questo ambito di ricerca sono particolarmente dibattuti in quanto, mentre molti lavori dimostrano un miglioramento clinico (Balsam L.B. *et al.*, 2004; Kawada H. *et al.*, 2004), altri invece non rilevano gli stessi risultati (Murry C.E. *et al.*, 2004; Nygren J.M. *et al.*, 2004) generando un forte dibattito su questo tipo di ricerca (Agbulut O. *et al.*, 2006; ter Horst K.W., 2010).

Tra le cellule staminali utilizzate nella ricerca e nella clinica, le cellule staminali mesenchimali da midollo osseo (BM-MSCs), come già descritto, sono le più utilizzate per la loro capacità immunomodulante, la loro multilinearità differenziativa e il loro alto potenziale di proliferazione (Charwat S. et al., 2008). A dispetto dei risultati positivi, la tracciabilità delle BM-MSCs trapiantate dimostra come, già dopo poche ore dopo il trapianto, esse sono tracciabili in una percentuale molto esigua (Dick A.J. *et al.*, 2003; Hill J.M. *et al.*, 2003; Kraitchman D.L. *et al.*, 2003). Hou e collaboratori hanno riportato che, già a distanza di 4-6 ore post-trapianto, solo il 2,6%, il 3,2% e l'11% delle cellule trapiantate con metodo intracoronarico, transvenoso retrogrado e intramiocardico rispettivamente, erano presenti nel sito di inoculo (Hou D. *et al.*, 2005): subito dopo il trapianto le BM-MSCs tendono a migrare immediatamente verso i polmoni, il fegato e la milza, mentre le poche che rimangono vanno incontro a fagocitosi e/o apoptosi per mancanza di vascolarizzazione (Freyman T. *et al.*, 2006). Il miglioramento clinico è probabilmente dovuto agli effetti paracrini scatenati dal trapianto delle BM-MSCs (Perez-Illarbe M. *et al.*, 2008).

In questo lavoro è stata verificata e confermata la tecnica di prelievo, isolamento ed espansione delle BM-MSCs, con l'intento di mantenere le caratteristiche proprie delle cellule come il fenotipo, pre- e post-transfezione con TAT-GFP<sup>+</sup>, le capacità di immunomodulazione e la capacità differenziativa. Inoltre, è stata altresì valutata presenza delle BM-MSCs GFP<sup>+</sup> a livello miocardico dopo trapianto avvenuto utilizzando la tecnica di iniezione intramiocardica diretta. Quest'ultimo risultato è stato valutato attraverso l'istologia standard, l'immunoistochimica (IHC) e la immunofluorescenza (IF).

Le procedure utilizzate per l'isolamento e l'espansione delle MSC per le applicazioni cliniche e sperimentali richiedono particolare attenzione al fine di ottenere un prodotto che

sia innanzitutto sicuro, per quanto riguarda la sterilità del prodotto stesso, ed efficace, in quanto tutte le manipolazioni che vengono effettuate non devono alterare le capacità rigenerative, trofiche ed immunomodulatorie di tali cellule (Mosna F. *et al.*, 2010). Inoltre le metodiche di analisi di tali proprietà devono essere standardizzate in modo da escludere tutte le variabili che possono esistere nella normale pratica di laboratorio. I metodi messi a punto e standardizzati in questo lavoro hanno permesso di analizzare tutti i punti critici dell'isolamento, caratterizzazione ed espansione delle BM-MSCs, al fine di ottenere lotti cellulari con caratteristiche e proprietà note. Tali test hanno dimostrato come l'espansione delle BM-MSCs, secondo i protocolli descritti, non alteri le proprietà fenotipiche e funzionali delle BM-MSCs. Infatti tali cellule, dopo l'espansione, presentano il fenotipo caratteristico delle BM-MSCs senza perdita dei marcatori mesenchimali classici (CD44, CD29, CD73, CD105, CD90) e non presentano contaminazioni da cellule ematopoietiche/monocitarie (CD45, CD34, CD14). Tali cellule differenziano efficacemente verso i tre lineage mesenchimali e conservano la capacità di dare origine a colonie fibroblastoidi con percentuali molto elevate. Infine, le BM-MSCs ottenute secondo le metodiche descritte mantengono la capacità di inibire la proliferazione di effettori immuni stimolati.

I risultati ottenuti sulle capacità immunomodulatorie delle BM-MSCs, mostrano come ad un basso rapporto MSC:PBMC stimolati (5:1), si ha un effetto immunosoppressivo mentre, ad un alto rapporto di MSC:PBMC stimolati (50:1), l'effetto è, invece, immunostimolante. L'effetto immunosoppressivo, ampiamente studiato, è per la maggior parte mediato da fattori solubili e molti sono quelli proposti, tra cui il TGF- $\beta$  (Nasef A. *et al.*, 2007), il fattore di crescita degli epatociti (Di Nicola M. *et al.*, 2002), l'ossido nitrico (Sato K. *et al.*, 2007) e l'HLA-G (Nasef A. *et al.*, 2007). Inoltre, l'enzima inibente il triptofano – indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) – gioca anch'esso un ruolo cruciale negli effetti immunosoppressori delle BM-MSCs (Meisel R. *et al.*, 2004). L'effetto immunostimolante, meno studiato del



precedente, è dovuto anch'esso a molteplici fattori: recentemente è stato scoperto che le MSCs posseggono la capacità di presentare l'antigene ai linfociti CD8<sup>+</sup> via MHC di classe I (François M. *et al.*, 2009) e che, in presenza di IFN- $\gamma$ , esse aumentano anche i livelli di MHC di classe II (Chan W.K. *et al.*, 2008). Un altro cruciale meccanismo riguarda la capacità delle MSCs di stimolare, attraverso il TGF- $\beta$  e IL-6, la trasformazione dei linfociti T stimolati in linfociti T helper tipo 17 (Th17). Da osservare che la stessa via può comunque, a basse concentrazioni MSC:linfociti, stimolare invece la trasformazione dei linfociti T stimolati in linfociti T regolatori (Treg) (Liu X.J. *et al.*, 2009).

Il fenotipo post-prelievo post-espansione descritto in precedenza, è stato mantenuto anche dopo la transfezione con la proteina TAT veicolante la GFP. In questo lavoro è stato confermato come le capacità di penetrazione cellulare della TAT è particolarmente efficace, raggiungendo una alta percentuale di positività in uno spazio temporale molto breve. Questo metodo di transfezione è stato valutato in alternativa ai classici vettori virali, come retro- e lentivirus, in quanto, a differenza di questi ultimi che necessitano di elevati livelli di biosicurezza sia di laboratorio che di stabulario (livello P3), esso non presenta invece nessun limite di biosicurezza. Uno svantaggio di tale metodologia è l'impossibilità di reperire la TAT-GFP<sup>+</sup> dopo le prime 36-48 ore (Recchia A. *et al.*, 2008) in quanto, essendo una proteina, essa viene metabolizzata dai normali processi fisiologici cellulari. In 6 cuori a 24h, 48h, 1 e 2 settimane trapiantati con BM-MSCs GFP<sup>+</sup> sono stati osservati cluster cellulari atipici non riconducibili a cellule miocardiche. Tale risultato è stato parzialmente confermato dall'immunofluorescenza (IF) dove la positività alla GFP non è stata adeguata, e la positività all'anticorpo mitocondriale umano, utilizzato per identificare le cellule di origine umana, si è osservata in 2 casi a 24h. Mentre l'IHC in questo tipo di studi non è una tecnica particolarmente utilizzata, l'uso dell'IF al confocale permette, da un lato, la precisa

localizzazione dell'antigene ricercato e lo studio multistrato e, dall'altro, consente di individuare se l'eventuale rigenerazione di miocardiociti *ex novo* avviene per processi di transdifferenziazione o di fusione (Rose R.A. *et al.*, 2008; Silva G.V. *et al.*, 2005). In questo lavoro è stata riscontrata una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) della positività dei cluster cellulari atipici osservati tra l'IHC e l'IF. Oltre a presentare diversità nel numero degli step di processazione, nella stabilità del cromogeno, nella relativa semplicità di osservazione dei preparati IHC rispetto a quelli in IF e alla risoluzione delle immagini, una differenza che potrebbe in parte chiarire questa divergenza trovata, riguarda l'amplificazione del segnale. Sia il cromogeno che il fluoroforo necessitano di metodi indiretti per l'amplificazione del segnale target attraverso la coniugazione all'anticorpo secondario di un enzima o di un fluoroforo e tali segnali possono essere ulteriormente amplificati se l'anticorpo secondario è coniugato con molecole di biotina (avidina, streptavidina e Neutravidina). Il metodo ABC utilizzato nell'IHC cromogena può formare un numero maggiore di complessi enzimatici avidina-biotina rispetto all'IF risultando in una maggiore amplificazione del segnale target rispetto ai metodi fluorescenti (ThermoScientific Immunofluorescence Method for IHC Detection). In tal modo, quindi, l'utilizzo in questo tipo di studi della tecnica di IHC affiancata all'IF, potrebbe aumentare significativamente il reperimento di cellule positive contribuendo, verosimilmente, a chiarire il motivo per cui nel trapianto di BM-MSCs in cuori infartuati, si osserva un miglioramento clinico senza, però, la presenza in numero adeguato di miocardiociti *ex novo* che probabilmente vengono sottodiagnosticati.

In conclusione, con questo lavoro si è definita la tecnica di prelievo, isolamento ed espansione delle BM-MSCs più adeguata per conservare le capacità di immunomodulazione e di differenziazione intrinseche di queste cellule. Oltre a ciò si è dimostrata l'efficacia della transfezione con TAT-GFP<sup>+</sup> mantenendone il fenotipo caratteristico ed è stata perfezionata

la tecnica di induzione di infarto miocardico acuto nel modello murino permettendo sia una diminuzione della mortalità, che una significativa riduzione delle tempistiche operatorie. Questi risultati hanno permesso, inoltre, di ridurre le probabilità di insorgenza di complicanze intrinseche alla procedure stesse. Un altro aspetto importante messo in luce da questo progetto è stata la valutazione della capacità dell'IHC di rilevare cellule di origine definita con una significativa differenza rispetto al metodo classico dell'IF aprendo, quindi, le porte a possibili futuri studi di comparazione e associazione di queste due tecniche diagnostiche.

In ultimo possiamo affermare che, come si evince da questo lavoro, le BM-MSCs sembrano partecipare ai processi riparativi post-infarto miocardico acuto, tuttavia l'aspetto tecnico di loro evidenziazione presenta problematiche che necessitano di ulteriori approfondimenti.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abumaree M., Al Jumah M., Pace R.A., Kalionis B. **Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells.** *Stem Cell Rev.* 2012 8(2): 375-92.

Agbulut O., Mazo M., Bressolle C., Gutierrez M., Azarnoush K., Sabbah L., Niederlander N., Abizanda G., Andreu E.J., Pelacho B., Gavira J.J., Perez-Ilzarbe M., Peyrard S., Bruneval P., Samuel J.L., Soriano-Navarro M., García-Verdugo J.M., Hagège A.A., Prósper F., Menasché P. **Can bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells regenerate infarcted myocardium?** *Cardiovasc Res.* 2006 72(1): 175-83.

Allender S., Scarborough P., Peto V., Rayner M., Leal J., Luengo-Fernandez R., Gray A. **European Cardiovascular disease statistics – 2008 Edition.**

Alpert J.S., Thygesen K., Antman E., Bassand J.P. **Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol.* 2000 36(3): 959–969.

Ambrose J.A., Barua R.S. **The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update.** *J Am Coll Cardiol.* 2004 43(10): 1731–1737.

Anversa P., Cheng W., Liu Y., Leri A., Redaelli G., Kajstura J. **Apoptosis and myocardial infarction.** *Basic Res Cardiol.* 1998 93 Suppl 3: 8-12.

Anversa P., Kajstura J., Rota M., Leri A. **Regenerating new heart with stem cells.** *J Clin Invest.* 2013 123(1): 62-70.

Anversa P., Kajstura J., Leri A., Bolli R. **Life and death of cardiac stem cell. A paradigm shift in cardiac biology.** *Circulation* 2006 113: 1451-1463.

Aries M.J., Elting J.W., Stewart R.E., de Keyser J., Thien T., Kremer B.P., Vroomen P.C. **Variations of Blood Pressure in Stroke Unit Patients May Result from Alternating Body Positions.** *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2012 21(6): 459-66.

Ariff Bongso; Eng Hin Lee (2005). "**Stem cells: their definition, classification and sources**". In Ariff Bongso; Eng Hin Lee. *Stem Cells: From Benchtop to Bedside.* World Scientific. pp. 5

Armstrong L., Lako M., Dean W., Stojkovic M. **Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer.** *Stem Cells* 2006 24: 805-14.

Assmus B., Schächinger V., Teupe C., Britten M., Lehmann R., Döbert N., Grünwald F., Aicher A., Urbich C., Martin H., Hoelzer D., Dimmeler S., Zeiher A.M. **Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI).** *Circulation.* 2002 106(24): 3009-17.

Assmus B., Honold J., Schächinger V., Britten M.B., Fischer-Rasokat U., Lehmann R., Teupe C., Pistorius K., Martin H., Abolmaali N.D., Tonn T., Dimmeler S., Zeiher A.M. **Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2006 355: 1222-1232

Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L., Kofidis T., Weissman I.L., Robbins R.C. **Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium.** *Nature* 2004 428(6983): 668-73.

Barile L., Messina E., Giacomello A., Marbán E. **Endogenous cardiac stem cells.** *Prog Cardiovasc Dis.* 2007 50(1): 31-48.

Bartunek J., Vanderheyden M., Vandekerckhove B., Mansour S., De Bruyne B., De Bondt P., Van Haute I., Lootens N., Heyndrickx G., Wijns W. **Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety.** *Circulation.* 2005 112(9 Suppl): I178-83.

Beckmann J., Scheitza S., Wernet P., Fischer J.C., Giebel B. **Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins.** *Blood* 109 (12): 5494–5501.

Beltrami A.P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. **Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.** *Cell* 2003;114: 763–7762.

Bertuzzi M., Negri E., Tavani A., La Vecchia C. **Family history of ischemic heart disease and risk of acute myocardial infarction.** *Prev Med.* 2003 37(3): 183–187.

Bhalli M.A. **Frequency of risk factors in male patients with acute coronary syndrome.** *J Coll Physicians Surg Pak.* 2011 21(5): 271-5.

Bifari F., Lisi V., Mimiola E., Pasini A., Krampera M. **Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells.** *Transfus Med Hemother.* 2008 35(3): 194-204.

Bishop J.E., Greenbaum R., Gibson D.G., Yacoub M., Laurent G.J. **Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease.** *J Mol Cell Cardiol.* 1990 22: 1157–1165

Brown R.H., Walters D.M., Greenberg R.S., Mitzner W. **A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice.** *J Appl Physiol.* 1999 87(6): 2362-5.

Bulger R.E. **Use of animals in experimental research: a scientist's perspective.** *Anat Rec.* 1987 219(3): 215-20.

Canto J.G., Goldberg R.J., Hand M.M., Bonow R.O., Sopko G., Pepine C.J., Long T. **Symptom presentation of women with acute coronary syndromes: myth vs reality.** *Arch. Intern. Med.* 2007 167(22): 2405–13

Caspi O., Gepstein L. **Potential applications of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.** *Ann NY Acad Sci* 2004 1015: 285-98.

Caulfield J.B. , Leinbach R., Gold H. **The relationship of myocardial infarct size and prognosis.** *Circulation* 1976 53: 1141-1144.

Cavasin M.A., Tao Z., Menon S., Yang X.P. **Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice.** *Life Sci.* 2004 75(18): 2181-92.

Chan W.K., Lau A.S., Li J.C., Law H.K., Lau Y.L., Chan G.C. **MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge.** *Exp Hematol.* 2008 36(11): 1545-55.

Charwat S., Gyöngyösi M., Lang I., Graf S., Beran G., Hemetsberger R., Nyolczas N., Sochor H., Glogar D. **Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art.** *Exp Hematol.* 2008 36(6): 672-80.

Chen S.L., Fang W.W., Ye F., Liu Y.H., Qian J., Shan S.J., Zhang J.J., Chunhua R.Z., Liao L.M., Lin S., Sun J.P. **Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.** *Am J Cardiol.* 2004 94(1): 92-5.

Chien K.R. **Stem cells: lost in translation.** *Nature.* 2004 428(6983): 607-8.

Chobanian A.V., Dzau V.J. **Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease.** In: Fuster V., Ross R., Topol E.J., eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 237-42.

Coventry L.L. **Sex differences in symptom presentation in acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis.** *Heart Lung.* 2011 40(6): 477-91.

Dai W., Kay G.L., Jyrala A.J., Kloner R.A. **Experience from experimental cell transplantation therapy of myocardial infarction: what have we learned?** *Cell Transplant.* 2012

Davies M.J. **A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease.** *Circulation* 1990 82: Suppl II: II-38.

De Coppi P., Barstch G., Atala A. **Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy.** *Nature Biotechnology* 2007 25(5): 100–106.

De Wood M.A. **Thrombosis in acute myocardial infarction and sudden death: angiographic aspects.** *Cardiovasc Clin.* 1987 18(1): 195-211.

Deans R.J., Moseley A.B. **Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.** *Exp Hematol.* 2000 28(8): 875-84.

Debaisieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B. **The ins and outs of HIV-1 Tat.** *Traffic* 2012 13(3): 355–63.

Detrano R., Guerci A.D., Carr J.J., Bild D.E., Burke G., Folsom A.R., Liu K., Shea S., Szklo M., Bluemke D.A., O'Leary D.H., Tracy R., Watson K., Wong N.D., Kronmal R.A. **Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups.** *N. Engl. J. Med.* 2008 358 (13): 1336–45.

Devine S.M., Hoffman R. **Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation.** *Curr Opin Hematol* 2000 7: 358-363.

Deyo D.J., Wei J. **A novel method of intubation and ventilation in mice.** *Anesth. Analg.* 1999; 88: S176.

Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S., Gianni A.M. **Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.** *Blood* 2002 99(10): 3838-43.



- Dib N., Khawaja H., Varner S., McCarthy M., Campbell A. **Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery.** *J Cardiovasc Transl Res.* 2011 4(2): 177-81.
- Dick A.J., Guttman M.A., Raman V.K., Peters D.C., Pessanha B.S., Hill J.M., Smith S., Scott G., McVeigh E.R., Lederman R.J. **Magnetic resonance fluoroscopy allows targeted delivery of mesenchymal stem cells to infarct borders in Swine.** *Circulation.* 2003 108(23):2899-904.
- Dietz G.P., Bähr M. **Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach.** *Mol Cell Neurosc* 2004 27(2): 85–131.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy.* 2006 8(4): 315-7.
- Farnaud S. **The evolution of the Three Rs.** *Altern Lab Anim.* 2009 37(3): 249-54.
- Fava C. **Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular disease.** *Semin Thromb Hemost.* 2011 37(3): 280-97.
- Fernandes S., Amirault J.C., Lande G., Nguyen J.M., Forest V., Bignolais O., Lamirault G., Heudes D., Orsonneau J.L., Heymann M.F., Charpentier F., Lemarchand P. **Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias.** *Cardiovasc Res.* 2006 69: 348–358.
- Focosi D. **Bone marrow aspiration and biopsy.** *N Engl J Med.* 2010 362(2): 182-3.
- François M., Romieu-Mourez R., Stock-Martineau S., Boivin M.N., Bramson J.L., Galipeau J. **Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties.** *Blood.* 2009 114(13): 2632-8.

- Frangogiannis N.G. **Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts.** *Curr Med Chem.* 2006 13(16): 1877–1893.
- Frankel A.D., Pabo C.O. **Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus.** *Cell* 1988 55 (6): 1189–93.
- Fraser J.K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M.H. **Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.** *Trends Biotechnol* 2006 24: 150–4.
- Freyman T., Polin G., Osman H., Crary J., Lu M., Cheng L., Palasis M., Wilensky R.L. **A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction.** *Eur Heart J.* 2006 27(9): 1114-22.
- Gao E., Lei Y.H., Shang X., Huang Z.M., Zuo L., Boucher M., Fan Q., Chuprun J.K., Ma X.L., Koch W.J. **A Novel and Efficient Model of Coronary Artery Ligation and Myocardial Infarction in the Mouse.** *Circ Res.* 2010 107: 1445-1453.
- Ge J., Li Y., Qian J., Shi J., Wang Q., Niu Y., Fan B., Liu X., Zhang S., Sun A., Zou Y. **Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI).** *Heart.* 2006 92(12): 1764-7.
- George J.C. **Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials.** *Trans Res.* 2010 155: 10–19.
- George J.C., Goldberg J., Joseph M., Abdulhameed N., Crist J., Das H., Pompili V.J. **Transvenous intramyocardial cellular delivery increases retention in comparison to intracoronary delivery in a porcine model of acute myocardial infarction.** *J Interv Cardiol* 2008 21: 424–433.
- Gershan W.M., Jacobi M.S., Thach B.T. **Mechanisms underlying induced autoresuscitation failure in BALB/c and SWR mice.** *J Appl Physiol.* 1992 72(2): 677-85.

Gibbons G.H., Pratt R.E., Dzau V.J. **Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia: autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II.** *J Clin Invest* 1992 90: 456-461.

Green M., Loewenstein P.M. **Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein.** *Cell* 1988 55(6): 1179-88.

Guan K., Nayernia K., Maier L.S., Wagner S., Dressel R., Lee J.H., Nolte J., Wolf F., Li M., Engel W., Hasenfuss G. **Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis.** *Nature*. 2006 27; 440.

Hagège A.A., Marolleau J.P., Vilquin J.T., Alhéritière A., Peyrard S., Duboc D., Abergel E., Messas E., Mousseaux E., Schwartz K., Desnos M., Menasché P. **Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients.** *Circulation*. 2006 4(114): 1108-13.

Halum S.L., Ting J.Y., Plowman E.K., Belafsky P.C., Harbarger C.F., Postma G.N., Pitman M.J., LaMonica D., Moscatello A., Khosla S., Cauley C.E., Maronian N.C., Melki S., Wick C., Sinacori J.T., White Z., Younes A., Ekbom D.C., Sardesai M.G., Merati A.L. **A multi-institutional analysis of tracheotomy complications.** *Laryngoscope*. 2012 122(1): 38-45.

Hamdi H., Planat-Benard V., Bel A., Puymirat E., Geha R., Pidial L., Nematalla H., Bellamy V., Bouaziz P., Peyrard S., Casteilla L., Bruneval P., Hagège A.A., Agbulut O., Menasché P. **Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections.** *Cardiovasc Res*. 2011 91(3): 483-91.

Hamdi H., Planat-Benard V., Bel A., Puymirat E., Geha R., Pidial L., Nematalla H., Bellamy V., Bouaziz P., Peyrard S., Casteilla L., Bruneval P., Hagège A.A., Agbulut O., Menasché P. **Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections.** *Cardiovasc Res*. 2011 91(3): 483-91.

Harrison, **Infarto miocardico con sopraslivellamento del tratto ST** - cap. 228 in Principi di Medicina Interna (16<sup>a</sup> edizione), New York - Milano, McGraw-Hill, 2006, pp. 1636.

Heim R., Cubitt A., Tsien R. **Improved green fluorescence.** *Nature* 1995 373(6516): 663-4.

Hill J.M., Dick A.J., Raman V.K., Thompson R.B., Yu Z.X., Hinds K.A., Pessanha B.S., Guttman M.A., Varney T.R., Martin B.J., Dunbar C.E., McVeigh E.R., Lederman R.J. **Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells.** *Circulation.* 2003 108(8): 1009-14.

Hipp J. **Sources of stem cells for regenerative medicine.** *Stem Cell Rev.* 2008 4(1): 3-11.

Hirsch A., Nijveldt R., van der Vleuten P.A., Tijssen J.G., van der Giessen W.J., Tio R.A., Waltenberger J., ten Berg J.M., Doevendans P.A., Aengevaeren W.R., Zwavinga J.J., Biemond B.J., van Rossum A.C., Piek J.J., Zijlstra F., HEBE Investigators. **Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial.** *Eur Heart J.* 2011 32(14): 1736-47.

Hou D., Youssef E.A., Brinton T.J., Zhang P., Rogers P., Price E.T., Yeung A.C., Johnstone B.H., Yock P.G., March K.L. **Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials.** *Circulation.* 2005 112: 1150-6.

Hudsmith L.E., Petersen S.E., Francis J.M., Robson M.D., Neubauer S. **Normal human left and right ventricular and left atrial dimensions using steady state free precession magnetic resonance imaging.** *J Cardiovasc Magn Reson.* 2005 7(5): 775-82.

Huikuri H.V., Kervinen K., Niemelä M., Ylitalo K., Säily M., Koistinen P., Savolainen E.R., Ukkonen H., Pietilä M., Airaksinen J.K., Knuuti J., Mäkikallio T.H., FINCELL Investigators. **Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction.** *Eur Heart J.* 2008 29(22): 2723-32.

Hwang W.S., Ryu Y.J., Park J.H., Park E.S., Lee E.G., Koo J.M., Jeon H.Y., Lee B.C., Kang S.K., Kim S.J., Ahn C., Hwang J.H., Park K.Y., Cibelli J.B., Moon S.Y. **Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst.** *Science* 2004 303: 1669-74.

Ingber D.E. **Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology.** *Circulation Research.* 2002 91(10): 877–887.

Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., Pocius J., Hartley C.J., Majesky M.W., Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K., Goodell M.A. **Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.** *J Clin Invest.* 2001 107(11): 1395-402.

Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2006 Jan 14;367(9505):113-21.

Jeang K. T. (1996) In: Human Retroviruses and AIDS: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos National Laboratory (Ed.) pp. III-3–III-18

Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. **Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.** *Nature* 2002 418(6893): 41-9.

Kajstura J., Leri A., Finato N., Di Loreto C., Beltrami C.A., Anversa P. **Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 95(15): 8801-5.

Kajstura J., Rota M., Cappetta D., Ogórek B., Arranto C., Bai Y., Ferreira-Martins J., Signore S., Sanada F., Matsuda A., Kostyla J., Caballero M.V., Fiorini C., D'Alessandro D.A., Michler R.E., del Monte F., Hosoda T., Perrella M.A., Leri A., Buchholz B.A., Loscalzo J., Anversa P. **Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart.** *Circulation.* 2012 126(15): 1869-81.

Kang H.J., Kim H.S., Zhang S.Y., Park K.W., Cho H.J., Koo B.K., Kim Y.J., Soo Lee D., Sohn D.W., Han K.S., Oh B.H., Lee M.M., Park Y.B. **Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial.** *Lancet.* 2004 363(9411): 751-6.

Kawada H., Fujita J., Kinjo K., Matsuzaki Y., Tsuma M., Miyatake H., Muguruma Y., Tsuboi K., Itabashi Y., Ikeda Y., Ogawa S., Okano H., Hotta T., Ando K., Fukuda K. **Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.** *Blood.* 2004 104(12): 3581-7.

Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** *Stem Cells* 2006 24: 1294–301.

Khader Y.S., Rice J., John L., Abueita O. **Oral contraceptives use and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis.** *Contraception* 2003 68(1): 11–7.

Knoops K.T., De Groot L.C., Kromhout D., Perrin A.E., Moreiras-Varela O., Menotti A., Van Staveren W.A. **Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project.** *JAMA* 2004 292(12): 1433-1439.

Koc Prockop D.J. **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** *Science* 1997; 276:71-74.

Kolk M.V., Meyberg D., Deuse T., Tang-Quan K.R., Robbins R.C., Reichenspurner H., Schrepfer S. **LAD-Ligation: A murine model of myocardial infarction.** *J Vis Exp.* 2009 (32): 1438.

Konstantinos H.E., Quevedo H., Oskouei B.N., Hu Q., Feigenbaum G.S., Margitich I.S., Mazhari R., Boyle A.J., Zambrano J.P., Rodriguez J.E., Dulce R., Pattany P.M., Valdes D., Revilla C., Heldman A.W., McNiece I., Hare J.M. **Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation.** *Circ Res* 2010; 107: 913-922.

Kraitchman D.L., Heldman A.W., Atalar E., Amado L.C., Martin B.J., Pittenger M.F., Hare J.M., Bulte J.W.. **In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction.** *Circulation.* 2003 107(18):2290-3.

Krampera M., Franchini M., Pizzolo G., Aprili G. **Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use.** *Blood Transfus.* 2007 5(3): 120-9.

Kueth F., Richartz B.M., Sayer H.G., Kasper C., Werner G.S., Höffken K., Figulla H.R. **Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions.** *Int J Cardiol.* 2004 97(1): 123-7.

Kumar V.M., Sheppard R., Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson. Tabella 11.2 in: *Robbins Basic Pathology.* Philadelphia: Saunders. 8th edition.

Kumashiro H., Kusachi S., Moritani H., Ohnishi H., Nakahama M., Uesugi T., Ayada Y., Nunoyama H., Tsuji T. **Establishment of a long-surviving murine model of myocardial infarction: qualitative and quantitative conventional microscopic findings during pathological evolution.** *Basic Res Cardiol.* 1999 94(2): 78-84.

Kurpisz M., Czepczyński R., Grygielska B., Majewski M., Fiszer D., Jerzykowska O., Sowiński J., Siminiak T. **Bone marrow stem cell imaging after intracoronary administration.** *Int J Cardiol.* 2007 121(2): 194-5.

Kusama Y. **Variant angina and coronary artery spasm: the clinical spectrum, pathophysiology, and management.** *J Nihon Med Sch.* 2011 78(1): 4-12.

Lacy F., O'Connor D.T., Schmid-Schonbein G.W. **Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension.** *J Hypertens* 1998 16: 291-303.

Laflamme M.A., Murry C.E. **Regenerating the heart.** *Nat Biotechnol* 2005 23(7): 845–856.

Lan C.C., Chang C.Y., Peng C.K., Wu C.P., Huang K.L., Lee S.C., Chang H. **Effect of body positions on hemodynamics and gas exchange in anesthetized pigs shortly after pneumonectomy.** *Shock* 2010 34(5): 482-7.

Lan C.C., Hsu H.H., Wu C.P., Huang K.L., Lee S.C., Chang C.Y., Peng C.K., Chang H. **Lateral position with the remaining lung uppermost improves matching of pulmonary ventilation and perfusion in pneumonectomized pigs.** *J Surg Res.* 2011 167(2): 55-61.

Ledwith M.B., Bloom S., Maloney-Wilensky E., Coyle B., Polomano R.C., Le Roux P.D. **Effect of body position on cerebral oxygenation and physiologic parameters in patients with acute neurological conditions.** *J Neurosci Nurs.* 2010 42(5): 280-7.

Lee-Lewandrowski E., Januzzi J.L. Jr, Grisson R., Mohammed A.A., Lewandrowski G., Lewandrowski K. **Evaluation of first-draw whole blood, point-of-care cardiac markers in the context of the universal definition of myocardial infarction: a comparison of a multimarker panel to troponin alone and to testing in the central laboratory.** *Arch Pathol Lab Med.* 2011 135(4): 459-63.



Leri A., Kajstura J., Anversa P. **Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration.** *Physiol Rev* 2005 85: 1373–1416.

Limongelli G., Calabro' P., Pacileo G., Santoro G., Calabrò R. **Myocardial infarction in a young athlete with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy and normal coronary arteries.** *Int J Cardiol* 2007 115(2): e71-3.

Linzbach A. J. **Heart failure from the point of view of quantitative anatomy.** *Am J Cardiol* 1960 5: 370-382.

Little R.A., Frayn K.N., Randall P.E., Stoner H.B., Morton C., Yates D.W., Laing G.S. **Plasma catecholamines in the acute phase of the response to myocardial infarction.** *Arch Emerg Med* 1986 3(1): 20–7.

Liu X.J., Zhang J.F., Sun B., Peng H.S., Kong Q.F., Bai S.S., Liu Y.M., Wang G.Y., Wang J.H., Li H.L. **Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-6.** *Clin Exp Immunol.* 2009 158(1): 37–44.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld J.G., Smith H.J., Taraldsrud E, Grøgaard H.K, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann J.E., Forfang K. **Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction.** *N Engl J Med.* 2006 355(12): 1199-209.

Ma N., Stamm C., Kaminski A., Li W., Kleine H.D., Müller-Hilke B., Zhang L., Ladilov Y., Egger D., Steinhoff G. **Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice.** *Cardiovascular Research.* 2005 66(1): 45–54.

Mallinson, T. **Myocardial Infarction.** *Focus on First Aid* 2010 (15): 15.

Marcus G.M., Cohen J., Varosy P.D., Vessey J., Rose E., Massie B.M., Chatterjee K., Waters D. **The utility of gestures in patients with chest discomfort.** *Am. J. Med.* 2007 120(1): 83–9.

Marijon E. **Sports-related sudden death in the general population.** *Circulation.* 2011 124(6): 672-81.

Maton, Anthea, (1993). *Human Biology and Health.* Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall

McSweeney J.C., Cody M., O'Sullivan P., Elberson K., Moser D.K., Garvin B.J. **Women's early warning symptoms of acute myocardial infarction.** *Circulation* 2003 108(21): 2619–23.

Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. **Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation.** *Blood.* 2004 103(12):4619-21.

Meluzín J., Mayer J., Groch L., Janousek S., Hornáček I., Hlinomaz O., Kala P., Panovský R., Prásek J., Kamínek M., Staníček J., Klabusay M., Korístek Z., Navrátil M., Dusek L., Vinklárková J. **Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function.** *Am Heart J.* 2006 152(5): 975.e9-15.

Méndez-Ferrer S., Ellison G.M., Torella D., Nadal-Ginard B. **Resident progenitors and bone marrow stem cells in myocardial renewal and repair.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Suppl 1: S83-9.

Mente A. **Metabolic syndrome and risk of acute myocardial infarction a case-control study of 26,903 subjects from 52 countries.** *J Am Coll Cardiol.* 2010 55(21): 2390-8.

Mirotsoy M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J., Gneccchi M., Dzau V.J. **Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart.** *J Mol Cell Cardiol.* 2011 50(2): 280-9.

Mitalipov S., Wolf D. **Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming.** *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2009 114: 185–99.

Moe K.T., Wong P. **Current trends in diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome.** *Ann. Acad. Med. Singap.* 2010, 39 (3): 210–5.

Mosna F., Sensebé L., Krampera M. **Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide.** *Stem Cells Dev.* 2010 19(10):1449-70.

Murphy J.C., Campbell N.P., McKeown P.P. **Alcohol induced myocardial infarction in two young brothers.** *Int J Cardiol.* 2008 127(3): e145-7.

Murry C.E., Field L.J., Menasché P. **Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point.** *Circulation* 2005 112(20): 3174–3183.

Murry C.E., Reinecke H., Pabon L.M. **Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair.** *J Am Coll Cardiol.* 2006 47(9): 1777-85.

Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., Field L.J. **Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.** *Nature.* 2004 428(6983): 664-8.

Myers R.H., Kiely D.K., Cupples L.A., Kannel W.B. **Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study.** *Am Heart J.* 1990 120(4): 963–969.

Mylotte L.A., Duffy A.M., Murphy M., O'Brien T., Samali A., Barry F., Szegezdi E. **Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment.** *Stem Cells.* 2008 26(5): 1325–1336.

Nakao S., Come P.C., Miller M.J., Momomura S., Sahagian P., Ransil B.J., Grossman W. **Effects of supine and lateral positions on cardiac output and intracardiac pressures: an experimental study.** *Circulation.* 1986 73(3): 579-85.

Nardi N.B., da Silva M.L. (2006). "Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization". In Wobus, Anna M.; Boheler, Kenneth. *Stem Cells. Handbook of experimental pharmacology.* 174. pp. 249-82

Nasef A., Chapel A., Mazurier C., Bouchet S., Lopez M., Mathieu N., Sensebé L., Zhang Y., Gorin N.C., Thierry D., Fouillard L. **Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells.** *Gene Expr.* 2007 13(4-5): 217-226.

Nasef A., Mathieu N., Chapel A., Frick J., François S., Mazurier C., Boutarfa A., Bouchet S., Gorin N.C., Thierry D., Fouillard L. **Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G.** *Transplantation.* 2007 84(2): 231-7.

National Heart, Lung and Blood Institute. Heart Attack Warning Signs. Retrieved November 22, 2006

NC3Rs/BBSRC/Defra/MRC/NERC/Wellcome Trust (2008) Responsibility in the use of animals in bioscience research: expectations of the major research councils and charitable funding bodies. London: NC3Rs

Nehler M.R., Taylor L.M. Jr, Porter J.M. **Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review.** *Cardiovasc Surg* 1997 6: 559-567.

Nienaber C. **The relationship between the perfusion deficit, infarct size and time after experimental coronary artery occlusion.** *Basic Res Cardiol.* 1983 78(2): 210-26.

Nyboe J., Jensen G., Appleyard M., Schnohr P. **Risk factors for acute myocardial infarction in Copenhagen. I: Hereditary, educational and socioeconomic factors. Copenhagen City Heart Study.** *Eur Heart J* 1989 10(10): 910–6.

Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Säwén P., Röhl W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K., Jacobsen S.E. **Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation.** *Nat Med.* 2004 10(5): 494-501.

Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Säwén P., Röhl W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K., Jacobsen S.E. **Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation.** *Nat Med.* 2004 10(5): 494-501.

Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J. **Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 100: 12.313–12.318.

Oliva P.B., Hammill S.C., Edwards W.D. **Cardiac rupture, a clinically predictable complication of acute myocardial infarction: report of 70 cases with clinicopathologic correlations.** *J Am Coll Cardiol* 1993 22: 720–726.

Olivetti G., Abbi R., Quaini F., Kajstura J., Cheng W., Nitahara J.A., Quaini E., Di Loreto C., Beltrami C.A., Krajewski S., Reed J.C., Anversa P. **Apoptosis in the failing human heart.** *N Engl J Med.* 1997 336(16): 1131-41.

Olivetti G., Capasso J.M., Sonnenblick E.H., Anversa P. **Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats.** *Circ Res.* 1990 67: 23–34.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. **Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.** *Nature.* 2001 410(6829): 701-5.

Otto Beitnes J., Oie E., Shahdadfar A., Karlsen T., Müller R.M., Aakhus S., Reinholt F.P., Brinchmann J.E. **Intramyocardial injections of human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction modulate scar formation and improve left ventricular function.** *Cell Transplant.* 2012 21(8): 1697-709.

Pappas P.J., Cernaianu A.C., Baldino W.A., Cilley J.H. Jr, DelRossi A.J. **Ventricular free-wall rupture after myocardial infarction.** *Treatment and outcome. Chest.* 1991 99(4): 892-5.

Pédélecq J., Cabantous S., Tran T., Terwilliger T., Waldo G. **Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein.** *Nat Biotechnol* 2006 24(1): 79–88.

Pelegrin P., Surprenant A. **Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates.** *EMBO Journal.* 2009 28(14): 2114–2127.

Penicka M., Horak J., Kobylka P., Pytlik R., Kozak T., Belohlavek O., Lang O., Skalicka H., Simek S., Palecek T., Linhart A., Aschermann M., Widimsky P. **Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study.** *J Am Coll Cardiol.* 2007 49(24): 2373-4.

Perez-Ilzarbe M., Agbulut O., Pelacho B., Ciorba C., San Jose-Eneriz E., Desnos M., Hagège A.A., Aranda P., Andreu E.J., Menasché P., Prósper F. **Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium.** *Eur J Heart Fail.* 2008 10(11): 1065-72.

Perin E.C., Lopez J. **Methods of stem cell delivery in cardiac diseases.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006 3: S110–3.

Peters A., von Klot S., Heier M., Trentinaglia I., Hormann A., Wichmann H.E., Löwel H., Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Study Group. **Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2004 351: 1721–1730.

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 1999 284: 143-147.

Prendergast F., Mann K. **Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*.** *Biochemistry* 1978 17(17): 3448–53.

Ratajczak M.Z., Machalinski B., Wojakowski W., Ratajczak J., Kucia M. **A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues.** *Leukemia* 2007 21(5): 860–7.

Recchia A., Rota D., Debetto P., Peroni D., Guidolin D., Negro A., Skaper S.D., Giusti P. **Generation of a alpha-synuclein-based rat model of Parkinson's disease.** *Neurobiol Dis.* 2008 30(1): 8-18.

Reinecke H., Poppa V., Murry C.E. **Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting.** *J Mol Cell Cardiol.* 2002 34(2): 241-9.

Reznik, A.G. **Morphology of acute myocardial infarction at pre-necrotic stage.** *Kardiologia* 2010, 50(1): 4–8.

Rivera B., Miller S., Brown E., Price R. **A novel method for endotracheal intubation of mice and rats used in imaging studies.** *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 2005 44(2): 52–55.

Robertson N.J., Brook F.A., Gardner R.L., Cobbold S.P., Waldmann H., Fairchild P.J. **Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 104: 20920-5.

Rose R.A., Keating A., Backx P.H. **Do mesenchymal stromal cells transdifferentiate into functional cardiomyocytes?** *Circ Res.* 2008 103(9) .

Russell, W.M.S., Burch R.L. (1992). *The Principles of Humane Experimental Technique*. Special Edition, 238pp. Wheathampstead, Herts., UK: Universities Federation for Animal Welfare

Sáenz-Morales D., Conde E., Escribese M.M., García-Martos M., Alegre L., Blanco-Sánchez I., García-Bermejo M.L. **ERK1/2 mediates cytoskeleton and focal adhesion impairment in proximal epithelial cells after renal ischemia.** *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2009 23(4-6): 285-294.

Salter B., Salter C. **Bioethical ambition, political opportunity and the European governance of patenting: The case of human embryonic stem cell science.** *Soc Sci Med.* 2012.

Salto-Tellez M., Yung Lim S., El-Oakley R.M., Tang T.P., ALmsherqi Z.A., Lim S.K. **Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model.** *Cardiovasc Pathol.* 2004 13(2): 91-7.

Sanz-Ruiz R., Gutiérrez Ibañes E., Villa Arranz A., Fernández Santos M.E., Sánchez Fernández P.L., Fernández-Avilés F. **Phases I-III Clinical Trials Using Adult Stem Cells.** *Stem Cells Int.* 2010: 579142.

Sato K., Ozaki K., Oh I., Meguro A., Hatanaka K., Nagai T., Muroi K., Ozawa K. **Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells.** *Blood.* 2007 109(1): 228-34.



Scannapieco F.A., Bush R.B., Paju S. **Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review.** *Ann Periodontol* 2003 8(1): 38–53.

Schächinger V., Erbs S., Elsässer A., Haberbosch W., Hambrecht R., Holschermann H., Yu J., Corti R., Mathey D.G., Hamm C.W., Süselbeck T., Assmus B., Tonn T., Dimmeler S., Zeiher A.M., REPAIR-AMI Investigators. **Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction.** *N Engl J Med.* 2006 355(12):1210-21.

Schatteman G. C., Awad O. **Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors.** *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 276(1): 13-21.

Schwarze S.R., Hruska K.A., Dowdy S.F. **Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?.** *Trends Cell Biol.* 2000, 10(7): 290–5.

Seegers V.F.M., Lee R.T. **Stem-cell therapy for cardiac disease.** *Nature* 2008 451(21): 938–942.

Segen J.C., Concise Dictionary of Modern Medicine, New York, McGraw-Hill, 2006

Shah V.K.K., Shalia K.K. **Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A Pot of Gold or Pandora's Box.** *Stem Cells Int.* 2011: 536758.

Sharma A.K. **Intracardiac thrombosis and acute myocardial infarction as initial presentation of antiphospholipid syndrome.** *Am J Med Sci.* 2011 342(3): 254-6.

Shimomura O., Johnson F., Saiga Y. **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea.** *J Cell Comp Physiol* 1962 59(3): 223–39.

Silva G.V., Litovsky S., Assad J.A., Sousa A.L., Martin B.J., Vela D., Coulter S.C., Lin J., Ober J., Vaughn W.K., Branco R.V., Oliveira E.M., He R., Geng Y.J., Willerson J.T., Perin E.C. **Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model.** *Circulation.* 2005; 111:150–156.

Siminiak T., Fiszler D., Jerzykowska O., Grygielska B., Rozwadowska N., Kałmucki P., Kurpisz M. **Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial.** *Eur Heart J.* 2005 26(12):1188-95.

Song H., Song B.W., Cha M.J., Choi I.G., Hwang K.C. **Modification of mesenchymal stem cells for cardiac regeneration.** *Expert Opin Biol Ther.* 2010 10(3): 309-19.

Spoelstra E.N., Ince C., Koeman A., Emons V.M., Brouwer L.A., van Luyn M.J., Westerink B.H., Remie R. **A novel and simple method for endotracheal intubation of mice.** *Lab Anim.* 2007 41(1): 128-35.

Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., Köstering M., Hernandez A., Sorg R.V., Kögler G., Wernet P. **Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.** *Circulation.* 2002 106(15): 1913-8.

Stryker J. **Animal rights and wrongs.** *Healthscan.* 1984 1(3):3-10.

Tarnavski O., McMullen J.R., Schinke M., Nie Q., Kong S., Izumo S. **Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies.** *Physiol Genomics.* 2004 16(3): 349-60.

Tatsumi T, Ashihara E, Yasui T, Matsunaga S, Kido A, Sasada Y, Nishikawa S, Hadase M, Koide M, Nakamura R, Irie H, Ito K, Matsui A, Matsui H, Katamura M, Kusuoka S, Matoba S, Okayama S, Horii M, Uemura S, Shimazaki C, Tsuji H, Saito Y, Matsubara H. **Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction.** *Circ J.* 2007 71(8): 1199-207.

Tendera M, Wojakowski W, Rużyło W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musiałek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak M.Z, REGENT Investigators. **Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial.** *Eur Heart J.* 2009 30(11): 1313-21.

Teo K.K, Ounpuu S, Hawken S, Pandey M.R, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, Zhang X, Yusuf S, **INTERHEART Study Investigators 2006 Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study.** *Lancet.* 2006 368(9536): 647-58.

ter Horst K.W. **Stem cell therapy for myocardial infarction: are we missing time?** *Cardiology.* 2010 117(1): 1-10.

Tullin S, Kongsbak Poulsen L, Bjørn S. **Fluorescent Proteins.** 2001 US patent

ThermoScientific Immunofluorescence Method for IHC Detection.

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5E999E03-FEE8-EDA8-D6C1-258EAF77FAA>

Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JCW. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995;332:635-641

Thygesen K., Alpert J.S., White H.D. **Universal definition of myocardial infarction.** *Eur. Heart J.* 2007 28(20): 2525–38.

Toma C., Pittenger M.F., Cahill K.S., Byrne B.J., Kessler P.D. **Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart.** *Circulation.* 2002 105(1): 93-8.

Torella D., Ellison G.M., Méndez-Ferrer S., Ibanez B., Nadal-Ginard B. **Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 3 Suppl 1: S8-13.

Tsien R. **The green fluorescent protein.** *Annu Rev Biochem* 1998 67: 509–44.

Ulloa-Montoya F., Verfaillie C.M., Hu W.S. **Culture systems for pluripotent stem cells.** *J Biosci Bioeng.* 1998, 100(1): 12–27.

Unlisted authors. **No consensus on stem cells.** *Nature* 2004 428: 587.

van der Laan A., Hirsch A., Nijveldt R., van der Vleuten P.A., van der Giessen W.J., Doevendans P.A., Waltenberger J., Ten Berg J.M., Aengevaeren W.R., Zwaginga J.J., Biemond B.J., van Rossum A.C., Tijssen J.G., Zijlstra F., Piek J.J. **Bone marrow cell therapy after acute myocardial infarction: the HEBE trial in perspective, first results.** *Neth Heart J.* 2008 16(12): 436-9.

Vanhoutte P.M., Boulanger C.M. **Endothelium-dependent responses in hypertension.** *Hypertens Res* 1995 18: 87-98.

Vergari A., Gunnella B., Rodolà F., Frassanito L., Musumeci M., Palazzesi S., Casalnuovo I.A. **A new method of orotracheal intubation in mice.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2004 8(3): 103-6.

Vergari A., Polito A., Musumeci M., Palazzesi S., Marano G. **Video-assisted orotracheal intubation in mice.** *Lab. Anim.* 2003 37(3): 204–206.

Villaron E. M., Almeida J., López-Holgado N., Alcoceba M., Sánchez-Abarca L.I., Sanchez-Guijo F.M, Alberca M., Pérez-Simon J.A., San Miguel J.F., Del Cañizo M.C. **Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Haematologica.* 2004 89: 1421–1427.

Wang J., Bo H., Meng X., Wu Y., Bao Y., Li Y. **A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse.** *Tex Heart Inst J.* 2006 33(3): 290-3.

Weissman I.L., Anderson D.J., Gage F. **Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001 17: 387-403.

Wen Z., Mai Z., Zhang H., Chen Y., Geng D., Zhou S., Wang J. **Local activation of cardiac stem cells for post-myocardial infarction cardiac repair.** *J Cell Mol Med.* 2012 16(11): 2549-63.

Williams A.R., Trachtenberg B., Velazquez D.L., McNiece I., Altman P., Rouy D., Mendizabal A.M., Pattany P.M., Lopera G.A., Fishman J., Zambrano J.P., Heldman A.W., Hare J.M. **Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling.** *Circ Res.* 2011 108(7): 792-6.

Williams M.J., Restieaux N.J., Low C.J. **Myocardial Infarction in young people with normal coronary arteries.** *Heart* 1998 79(2): 191–4.

Wilson A.M., Ryan M.C., Boyle A.J. **The novel role of C-reactive protein in cardiovascular disease: risk marker or pathogen.** *Int J Cardiol* 2006 106(3): 291–7.

Wilson P.W., D'Agostino R.B., Levy D., Belanger A.M., Silbershatz H., Kannel W.B. **Prediction of coronary heart disease using risk factor categories.** *Circulation* 1998 97(18): 1837–47.

Wollert K.C., Meyer G.P., 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. **Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial.** *Lancet.* 2004 364(9429): 141-8.

Woollard K.J., Geissmann F. **Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions.** *Nat Rev Cardiol* 2010 7(2): 77-86.

World Health Organization. **Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature.** *Circulation* 1979 59(3): 607-9.

Jneid H., Anderson J.L., Wright R.S., Adams C.D., Bridges C.R., Casey D.E. Jr, Ettinger S.M., Fesmire F.M., Ganiats T.G., Lincoff A.M., Peterson E.D., Philippides G.J., Theroux P., Wenger N.K., Zidar J.P. **ACCF/AHA 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.** *J Am Coll Cardiol* 2012 14;60(7): 645-81.

Yao E.H., Yu Y., Fukuda N. **Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases.** *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 2006 7(2): 101-108.

Young P.P., Vaughan D.E., Hatzopoulos A.K. **Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy.** *Prog Cardiovasc Dis* 2007 49(6): 421-429

Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., Bautista L., Franzosi M.G., Commerford P., Lang C.C., Rumboldt Z., Onen C.L., Lisheng L., Tanomsup S., Wangai P. Jr, Razak F., Sharma A.M., Anand S.S., INTERHEART Study Investigators. **Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study.** *Lancet* 2005 366(9497): 1640-9.

Zhang S., Sun A., Xu D., Yao K., Huang Z., Jin H., Wang K., Zou Y., Ge J. **Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials.** *Clin Cardiol.* 2009 32(8): 458-66.

Zhang Y., Sievers R.E., Prasad M., Mirsky R., Shih H., Wong M.L., Angeli F.S., Ye J., Takagawa J., Koskenvuo J.W., Springer M.L., Grossman W., Boyle A.J., Yeghiazarians Y. **Timing of bone marrow cell therapy is more important than repeated injections after myocardial infarction.** *Cardiovasc Pathol.* 2011 20(4): 204-12.

Zhu W.G., Li S., Lin L.Q., Yan H., Fu T., Zhu J.H. **Vascular oxidative stress increases dendritic cell adhesion and transmigration induced by homocysteine.** *Cellular Immunology.* 2009 254(2): 110-116.

Zovoilis A., Nolte J., Drusenheimer N., Zechner U., Hada H., Guan K., Hasenfuss G., Nayernia K., Engel W. **Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles.** *Mol Hum Reprod.* 2008 14(9): 521-9.

Zwi-Dantsis L., Gepstein L. **Induced pluripotent stem cells for cardiac repair.** *Cell Mol Life Sci.* 2012 69(19): 3285-99.

## RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il mio Tutor, la Prof.ssa Zappulli, e tutto lo studio dove ho passato gli ultimi anni. Il Prof. Castagnaro, la Dr.ssa Cavicchioli e la SuperRobi Dr.ssa Rasotto! E tutti gli stratosferici colleghi del Dipartimento! L'elenco sarebbe lungo...quindi lo faccio! Grazie a Rossella, Davide ed Enri, grazie a Diego, Silvia, Maria Elena e Sandro, Luca e l'Arianna, dottoranda alla fine pure lei! Certo, grazie anche a te che non leggi il tuo nome perché me lo sono dimenticato!! ;D

Ringrazio anche il Corit, nelle persone del Dr. Cozzi, della Dr.ssa Seveso e degli altri colleghi incontrati e conosciuti in questi anni! Siete stati e siete dei fenomeni! Un saluto alla Marta, Elena, Federica, Veronica e tutti gli amici e colleghi dello stabulario, il Dr. Fante, mitico effe effe, al Dr. Boldrin e a tutti i tecnici, in modo particolare Daniele, Andrea e il mitico Luigino! Grazie anche a Giorgio e a Patrizia che ancora attendono...vi porterò tutto! Di questo gruppo, vorrei dare un carissimo e caloroso ringraziamento alla persona che molto mi ha insegnato con pazienza e pazienza e ancora pazienza! Il grande Dr. Arben Dedja, micro chirurgo e scrittore famoso!!

Ringrazio la Prof.ssa Valente, la Dr.ssa Della Barbera e Luca, per l'immane pazienza e la disponibilità nell'aiutarmi in questo dottorato! Ringrazio anche i Colleghi di Verona, il Dr. Krampera e il Dr. Bassi per la disponibilità...e le cellule! Grazie anche alla Prof.ssa Parolin e alla Dr.ssa Del Vecchio di Virologia.

In ultimo, visto che il percorso di dottorato è anche un percorso di vita, vorrei ringraziare la mia famiglia che da sempre mi sostiene in ogni scelta, e tutti gli amici che mi sono stati vicini e mi hanno sopportato! Anche dentro le passioni, come gli amici del leon-club.it, di cui ho l'onore di far parte! Insomma, grazie a tutti! La vostra vicinanza mi ha sempre aiutato a vedere il positivo che c'è in ogni cosa, difficile o semplice che sia!