



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Centro Interdipartimentale di Ricerca e di Servizi
per la Biologia e la Medicina della Rigenerazione

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI
XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

CARATTERIZZAZIONE E PLASTICITÀ DIFFERENZIA TIVA DI POPOLAZIONI CELLULARI STAMINALI ISOLATE DA SANGUE PERIFERICO

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maria Teresa Conconi

Supervisore: Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Dottoranda: Alessia Tasso

*“Ci teniamo tutti ad essere accettati,
ma dovete credere che i vostri pensieri siano unici e vostri
anche se agli altri sembrano strani e impopolari”
(“L’attimo fuggente”)*

Alla mia famiglia

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------|
| RIASSUNTO | pag.1 |
| ABSTRACT | pag.3 |
| INTRODUZIONE | pag.5 |
| 1. Le cellule staminali | pag.5 |
| 1.1 Classificazione della “staminalità” | pag.5 |
| 1.1.1 Cellule staminali embrionali (ESC) | pag.6 |
| 1.1.2 Cellule staminali adulte | pag.9 |
| <i>a) Cellule staminali mesenchimali (MSC)</i> | pag.9 |
| <i>b) Cellule staminali circolanti nel sangue periferico</i> | pag.12 |
| 2. Applicazioni delle cellule staminali nell’ingegneria tissutale | pag.18 |
| 2.1 Terapia staminale in campo cardiologico | pag.19 |
| 2.1.1 Valvulopatie | pag.19 |
| <i>a) Stenosi valvolare aortica</i> | pag.19 |
| <i>b) Insufficienza valvolare aortica</i> | pag.21 |
| 2.1.2 Terapia delle valvulopatie | pag.22 |
| 2.1.2.1 Terapia cellulare | pag.22 |
| <i>a) Cellule staminali da midollo osseo</i> | pag.22 |
| <i>b) Cellule staminali mesenchimali (MSC)</i> | pag.22 |
| <i>c) Cellule progenitrici endoteliali (EPC)</i> | pag.24 |
| <i>d) Cellule staminali ematopoietiche (HSC)</i> | pag.25 |
| <i>e) Very Small Embryonic-like Stem Cells (VSELs)</i> | pag.25 |
| <i>f) Cellule staminali mobilitate da midollo osseo</i> | pag.26 |
| 2.1.2.2 Protesi valvolari cardiache | pag.28 |
| <i>a) Protesi meccaniche e biologiche</i> | pag.28 |
| <i>b) Protesi biologiche ingegnerizzate sintetiche e naturali</i> | pag.30 |
| <i>c) Matrici valvolari acellulari porcine</i> | pag.31 |
| SCOPO DELLA TESI | pag.33 |
| MATERIALI E METODI | pag.35 |
| 1. Isolamento di cellule multipotenti da sangue periferico | pag.35 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 2. Analisi di microscopia ottica | pag.36 |
| 3. Studio della morfologia cellulare mediante microscopia elettronica | pag.36 |
| 4. Studio dell'immunofenotipo | pag.36 |
| 4.1 Basi teoriche della CFM | pag.36 |
| 4.2 Principio di funzionamento della CFM | pag.38 |
| 4.3 Caratterizzazione fenotipica delle popolazioni CSP | pag.36 |
| <i>a) Analisi di citometria</i> | pag.39 |
| <i>b) Immunocitochimica</i> | pag.40 |
| 5. Valutazione della stabilità fenotipica delle popolazioni CSP | pag.41 |
| 6. Identificazione del Doubling population | pag.41 |
| 7. Studio della potenzialità multidifferenziativa delle popolazioni CSP | pag.42 |
| 7.1 Differenziamento adipogenico | pag.42 |
| 7.1.1 Colorazione Oil Red O | pag.43 |
| 7.2 Differenziamento osteogenico | pag.43 |
| 7.2.1 Colorazione Von Kossa | pag.43 |
| 7.3 Differenziamento cardiomiogenico | pag.44 |
| 7.3.1 Immunofluorescenza e microscopia confocale | pag.44 |
| 7.3.2 RT-PCR: reazione di retrotrascrizione e polimerizzazione a catena | pag.45 |
| <i>a) Estrazione di mRNA</i> | pag.45 |
| <i>b) Quantificazione spettrofotometrica di RNA mediante NANODROP</i> | pag.46 |
| <i>c) Reazione di retrotrascrizione</i> | pag.46 |
| <i>d) PCR: reazione polimerasica a catena</i> | pag.46 |
| <i>e) Elettroforesi su gel di agarosio</i> | pag.47 |
| 7.3.3 Western Blotting | pag.48 |
| <i>a) Estrazione delle proteine</i> | pag.48 |
| <i>b) Quantificazione degli estratti cellulari</i> | pag.48 |
| <i>c) Analisi mediante Sodio Dodecil Solfato Poliacrilammide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)</i> | pag.49 |
| <i>d) Immunoblotting</i> | pag.49 |
| <i>e) Rivelazione</i> | pag.50 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 8. Valutazione della crescita delle popolazioni CSP su matrici valvolari acellulari | pag.50 |
| 8.1 Decellularizzazione dei lembi aortici e polmonari mediante il metodo TRICOL | pag.50 |
| 8.2 Trattamento dei lembi decellularizzati prima della semina cellulare | pag.51 |
| 8.3 Semina delle cellule su lembi valvolari decellularizzati aortici (VDA) e polmonari (VDP) | pag.52 |
| <i>a) Studio morfologico mediante SEM</i> | pag.52 |
| <i>b) Immunofluorescenza delle matrici VDA e VDP ingegnerizzate</i> | pag.53 |
| | |
| RISULTATI | pag.55 |
| 1. Colture cellulari e capacità proliferativa | pag.55 |
| 2. Caratterizzazione fenotipica delle cellule CSP mediante citometria e immunocitochimica | pag.57 |
| 3. Caratterizzazione del potenziale multidifferenziativo delle cellule CSP | pag.60 |
| 3.1 Differenziamento adipogenico ed osteogenico | pag.60 |
| 3.2 Differenziamento cardiomiogenico | pag.61 |
| <i>a) Caratterizzazione morfologica mediante SEM</i> | pag.61 |
| <i>b) RT-PCR</i> | pag.62 |
| <i>c) Immunofluorescenza e Western Blotting</i> | pag.64 |
| 4. Crescita delle CSP su matrici valvolari decellularizzate | pag.65 |
| | |
| DISCUSSIONE | pag.71 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | pag.75 |
| | |
| RINGRAZIAMENTI | pag.91 |

RIASSUNTO

Le cellule staminali sono cellule primitive indifferenziate, dotate di capacità proliferativa illimitata e in grado di differenziare in cellule specializzate in presenza di stimoli specifici. Nell'ultimo decennio, grande interesse è stato rivolto all'impiego in campo medico di cellule staminali adulte che, rispetto alle cellule staminali embrionali totipotenti, non comportano la distruzione dell'embrione per il loro ottenimento e pertanto non sollevano alcun problema di carattere etico. Le cellule staminali adulte sono cellule prevalentemente multipotenti, identificate in nicchie a livello del tessuto adiposo, del midollo osseo e della cute di individui adulti e bambini. Studi sperimentali hanno evidenziato che nel sangue periferico animale e umano sono presenti cellule ad alta capacità plastica e che dunque potrebbero essere utilizzate in clinica per lo sviluppo di programmi di terapia cellulare ed il recupero di danni tissutali refrattari alle terapie mediche classiche. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) hanno dimostrato di essere idonee all'impiego *in vivo* per lo sviluppo di programmi di terapia cellulare.

È stato inoltre dimostrato che, in definite condizioni di coltura, le cellule MSC possono acquisire un fenotipo simil-cardiomiocitario. La strategia più comune utilizzata per indurre il loro differenziamento cardiomiogenico *in vitro* è il trattamento per 24 ore con la 5-azacitidina (5-AZA), un agente chimico demetilante del DNA. Dopo induzione, le cellule mostrano una morfologia miotubulare, caratterizzata dalla presenza di unità sarcomeriche, un nucleo centrale e tipici granuli atriali. Similmente ai cardiomiociti fetali ventricolari, esse esprimono proteine contrattili, quali l' α -actina, la catena pesante (MHC) e leggera della miosina (MLC).

Nel corso degli ultimi dieci anni, lo sviluppo dell'ingegneria tissutale delle valvole cardiache ha aperto un nuovo orizzonte verso l'utilizzo di un costrutto biocompatibile in grado di essere rimodellato dopo l'impianto. Numerosi studi hanno messo in luce l'efficacia delle matrici naturali acellulari per il recupero di danni tissutali a livello muscolare, osseo e tracheale. I metodi sperimentati per la decellularizzazione di valvole aortiche e polmonari hanno previsto l'uso di detergenti quali il sodio dodecilsolfato (SDS), il sodio deossicolato (SD), il sodio colato (SC), il Triton X-100 (TX) e l'enzima tripsina. Il trattamento TRICOL, che comprende l'uso di TX, sodio colato (SC), soluzioni ipo- ed iper-toniche e Benzonase, è stato sviluppato da Spina e collaboratori per la preparazione di valvole porcine aortiche e polmonari.

L'ingegnerizzazione della matrice con cellule autologhe isolate da sangue periferico potrebbe ottimizzare l'attecchimento dell'impianto e consentire il suo mantenimento in sede fino a completa integrazione. Lo scopo della tesi è stato isolare cellule circolanti multipotenti da sangue periferico, idonee ad applicazioni di ingegneria tissutale. Lo studio è stato eseguito utilizzando il modello animale minipig. Sono state isolate popolazioni fibroblastoidi mediante la tecnica di adesione alla plastica, aventi fenotipo CD44^{high}, CD106⁺, CD90^{low}, SLA-DR^{low}, CD45⁻, CD34⁻, CXCR4⁻ (CSP). L'espansione a lungo termine, eseguita per 39 passaggi, ha dimostrato che le popolazioni CSP sono altamente stabili da un punto di vista fenotipico e morfologico, come dimostrato mediante analisi citometrica e di microscopia ottica su subcolture intermedie VIII, XXIV e XXXIX. Inoltre, la specifica induzione con terreni differenziativi in senso adipogenico, osteogenico e cardiomiogenico ha dimostrato che le cellule CSP sono cellule plastiche, che rispondono agli stimoli in modo specifico accumulando trigliceridi, producendo matrice extracellulare mineralizzata ed esprimendo marcatori cardiomiogenici quali il fosfolambano, l'alfa-actina muscolo specifica e la troponina cardiaca T. Allo scopo di valutare le potenzialità di impiego in campo cardiologico di popolazioni circolanti con immunofenotipo CD44^{high}, CD106⁺, CD90^{low}, SLA-DR^{low}, CD45⁻, CD34⁻, CXCR4⁻, è stata oggetto di studio la crescita delle cellule CSP su matrici valvolari decellularizzate (VD) aortiche e polmonari. La valutazione dell'adesione è stata eseguita mediante analisi SEM a differenti intervalli di tempo (7, 14, 28, 35 e 42 giorni). Lo studio morfologico mediante analisi SEM ha dimostrato la colonizzazione della superficie di semina da parte delle cellule CSP e la loro organizzazione in monostrati continui. Lo studio istologico mediante immunofluorescenza ha evidenziato sui campioni la presenza di elastina e di collagene (IV e I) mentre lo studio immunostochimico ha dimostrato la positività delle cellule per l'alfa-actina cellulare scheletrica.

ABSTRACT

Stem cells are primitive undifferentiated cells with unlimited proliferative capacity and defined differentiative abilities under specific stimuli. Over the last decade, great interest has been addressed versus the clinical use of adult stem cells that, in comparison to embryonic stem cells, do not involve the destruction of embryos to be obtained and therefore do not induce any ethical problem. Adult stem cells are mostly multipotent and are present within niches in adipose tissue, bone marrow and skin of adults and children. Experimental studies have shown that multipotent stem cells are present in animal and human peripheral blood and their potentialities make them ideal candidate for clinical programs of cell therapy to restore structural or functional tissue defects that are difficult to be solved with traditional medical therapies.

It was also shown that, using *in vitro* defined culture conditions, they can be modified acquiring cardiomyocyte phenotype. After 24h exposure with DNA demethylating chemical 5-azacitidine (5-AZA), the commonest strategy to induce the *in vitro* cardiac differentiation, MSC demonstrated a cardiomyocyte-like ultrastructure, including typical sarcomeres, a centrally positioned nucleus and atrial granules. The expression of contractile protein genes for myosin heavy chain, myosin light chain and α -actin, confirmed them to be similar to the foetal ventricular cardiomyocytes.

In the last decade, the development of the heart valve tissue engineering provided promises to obtain fully compatible grafts able, after transplantation, to be *in vivo* remodelled. Researchers have demonstrated the efficacy of acellular and natural matrices to repair muscle, bone and trachea. Some of the most widely used techniques have involved detergents such as sodium dodecylsulphate (SDS), sodium deoxycholate (SD), sodium cholate (SC), Triton X-100 (TX) and trypsin enzyme. TRICOL, a technique employing TX, sodium cholate (SC), hypo- and hyper-tonic solutions and Benzoylase has been developed by Spina *et al.* to obtain porcine aortic and pulmonary valves. Acellular matrices have been tested in combination or not with differentiated tissue-specific cells (endothelial and/or smooth muscle cells), autologous or allogenic stem cells. Seeding peripheral blood-derived autologous cells on acellular matrices could optimize the *in vivo* functionality of the implant to its final complete integration.

The aim of this thesis has been the isolation of circulating cells from peripheral blood to be used in tissue engineering strategies. The study involved minipig as animal model. CD44^{high}, CD106⁺, CD90^{low}, SLA-DR^{low}, CD45⁻, CD34⁻, CXCR4⁻ (CSP) fibroblastic

cells have been isolated using the strategy by adherence to plastic. The long term expansion has been performed for 39 passages and demonstrated that CSP phenotype and morphology are highly stable, as cytometrical study and microscopical analysis demonstrated on subcultures VIII, XXIV and XXXIX. Moreover, the specific induction with adipogenic, osteogenic and cardiomyogenic media revealed that CSP cells are able to specifically respond to the induction stimuli, accumulating lipids within cytoplasm, producing mineralized extracellular matrix and expressing cardiomyogenic markers such as phospholamban, alpha actin muscle specific and troponin T. In order to test the clinical potentialities of CD44^{high}, CD106⁺, CD90^{low}, SLA-DR^{low}, CD45⁻, CD34⁻, CXCR4⁻ circulating cells, in cardiological field, the seeding of CSP cells has been performed on acellular porcine valves (VD) (aortic and pulmonary) as scaffolds. The cellular adhesion has been studied by SEM at different time points (7, 14, 28, 35 and 42 days). The morphological study by SEM demonstrated that CSP cells colonized the seeding surface and organized themselves into continuous monolayers. The histological study by immunofluorescence showed the presence of elastin and collagen (IV and I) whereas immunohistochemistry demonstrated the positivity of cells for alpha actin.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio, l'impiego di cellule staminali in campo biomedico ha definito una grande svolta nella terapia dei difetti funzionali e strutturali di organi e tessuti. In particolare, la progettazione e la realizzazione di sostituti tessutali ingegnerizzati (STI) con cellule staminali rappresenta una innovativa strategia terapeutica che l'Ingegneria tessutale propone oggi in alternativa alle tradizionali protesi sintetiche. Tali innovative protesi tessutali offrono il vantaggio di essere progettabili sulle specifiche necessità del paziente e altamente compatibili grazie ad una matrice di supporto inerte e cellule staminali autologhe che ne favoriscono l'attecchimento nel ricevente. Per le possibilità immediate di impiego in campo clinico, un particolare interesse è rivolto oggi alle cellule staminali adulte (CSA), cioè cellule "multipotenti" identificate in numerosi distretti tessutali in età post natale quali il midollo osseo, la cute, il cordone ombelicale ed il tessuto adiposo. Evidenze sperimentali accumulate negli ultimi anni portano a considerare la presenza di cellule staminali multipotenti anche a livello del sangue periferico (Seta e Kuwana, 2007).

1. Le cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule non specializzate la cui caratteristica principale è quella di andare incontro ad una mitosi definita "asimmetrica" o differenziativa che dà origine a due cellule figlie, di cui una procede verso il differenziamento ("*commitment*"), mentre l'altra preserva le caratteristiche di staminalità ("*self-renewal*"). Questa proprietà consente l'omeostasi tessutale ed assicura il corretto turnover cellulare in tutti i tessuti dell'organismo.

1.1 Classificazione della "staminalità"

Le cellule staminali si distinguono per potenzialità differenziativa ed origine. In base alla *capacità differenziativa* le cellule staminali sono distinte in quattro tipologie (Ratajczak *et al.*, 2008) (Figura 1):

1. *totipotenti*, che sono in grado di generare tutte le cellule e i tessuti che compongono l'embrione, compresi gli annessi embrionali quali placenta e cordone. La totipotenza caratterizza lo zigote e i blastomeri derivati dalle prime due divisioni;

2. *pluripotenti*, che generano le cellule dei tre foglietti embrionali;
3. *multipotenti*, che sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule;
4. *unipotenti*, che possono generare solamente un tipo di cellula specializzata.

In base all'origine, esse si classificano in *embrionali* e *adulte*.

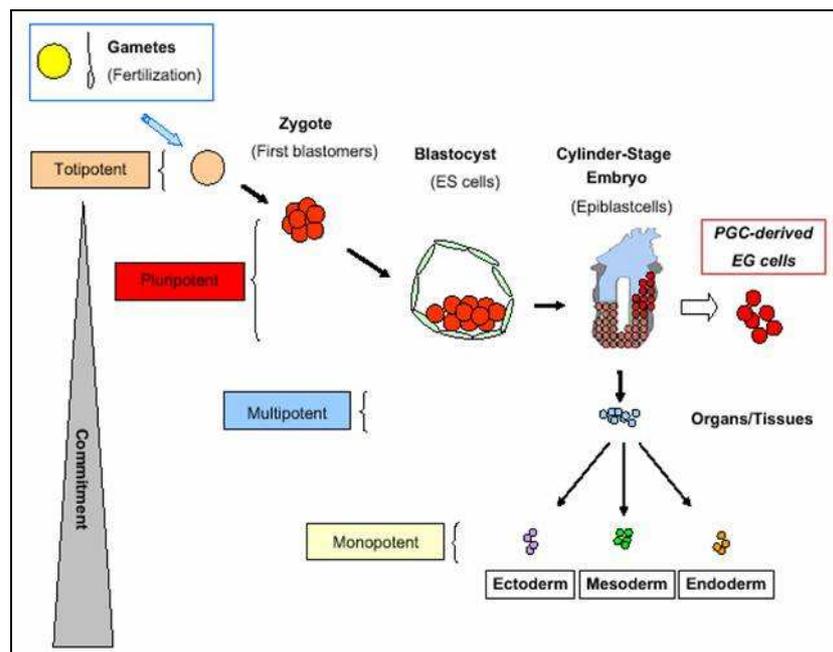


Figura 1. Sviluppo gerarchico del compartimento cellulare staminale.

1.1.1 Cellule staminali embrionali (ESC)

Le cellule staminali embrionali (*embryonic stem cells*, ESC) (Surani *et al.*, 2007) provengono da un embrione allo stadio di blastocisti, quindi a 4-5 giorni dalla fecondazione (Figura 2). La blastocisti è costituita da tre strutture: un sottile strato cellulare più esterno, chiamato *trofoblasto*, da cui prendono origine i tessuti extraembrionali; una cavità interna o *blastocela* e la *massa cellulare interna* (ICM), un gruppo di circa 30 cellule all'interno del blastocela, destinato a svilupparsi in embrione.

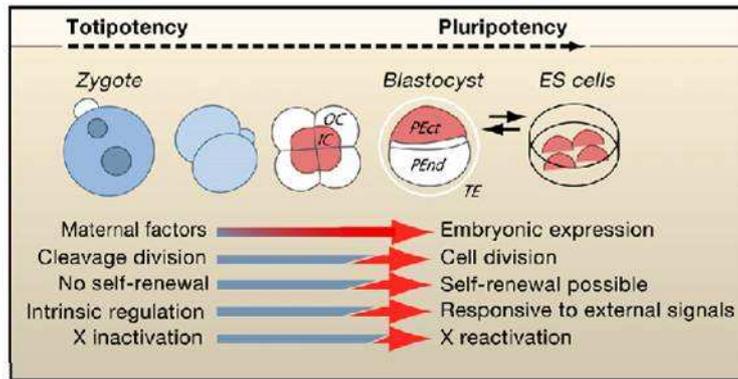


Figura 2. Transizione da totipotenza a pluripotenza. Durante le fasi precoci dell’embriogenesi, nell’embrione allo stadio di morula sono presenti le cellule interne (IC) e le cellule esterne (OC). Crescendo, esso sviluppa una cavità centrale diventando blastocisti. Le IC sono i precursori delle cellule pluripotenti primitive ectodermiche (PEct) all’interno della ICM, contenente anche lo strato esterno delle cellule primitive endodermiche (PEnd). Per effetto della riprogrammazione epigenetica, le cellule primitive ectodermiche generano cellule pluripotenti che in adatte condizioni possono essere espanse in maniera indefinita *in vitro*.

Le cellule staminali embrionali sono cellule pluripotenti, capaci quindi di generare tutti i differenti tipi cellulari presenti nell’organismo. Durante lo sviluppo embrionale, marcatori genetici di pluripotenza, quali Oct-4, Nanog e Sox-2, indirizzano le ESC verso la specificazione tessutale, dando origine ai tre foglietti germinativi (Nichols *et al.*, 1998; Surani *et al.*, 2007). A causa della loro grande potenzialità proliferativa e differenziativa, sono oggetto di studio per una eventuale applicazione in medicina rigenerativa (Donovan e Gearhart, 2001; Prella *et al.*, 2002) (Figura 3). Numerosi studi hanno dimostrato che le ESC possono essere estratte e replicate *ex vivo*. Sono geneticamente manipolabili ma evolvono in formazioni tumorali (teratocarcinomi) quando trapiantate in sede ectopica (Solter *et al.*, 1970; Diwan e Stevens, 1976). Il loro utilizzo è limitato a causa delle implicazioni di ordine etico.

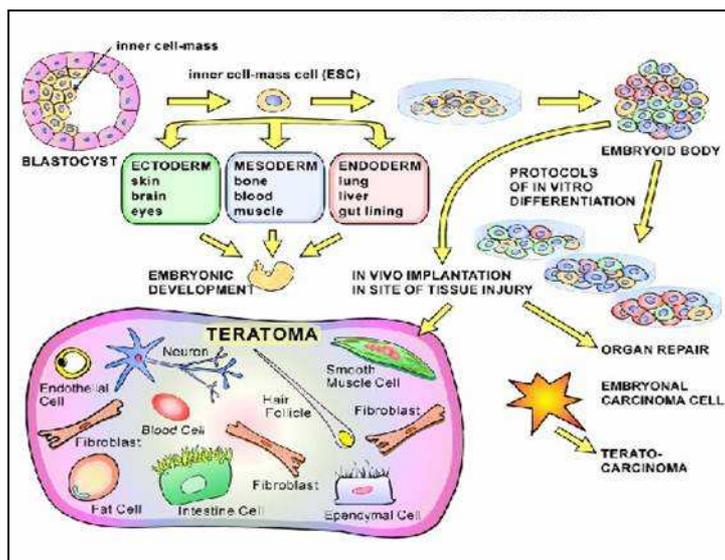


Figura 3. Cellule staminali embrionali. Durante lo sviluppo, le ESC originano l'ectoderma, il mesoderma e l'endoderma. Derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti e *in vitro* formano corpi embrionali contenenti cellule non differenziate (gialle), cellule dell'ectoderma (verdi), cellule del mesoderma (blu) e cellule dell'endoderma (rosse). L'impianto *in vivo* dei corpi embrionali può riparare organi danneggiati e generare tumori.

Le prime linee di cellule staminali embrionali murine sono state isolate nel 1981 dalla ICM di blastocisti di topo (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Se mantenute in coltura su un *feeder layer* di fibroblasti embrionali di topo (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF), o in presenza del *leukemia inhibitory factor* (LIF), le ESC mantengono la loro capacità proliferativa nonché il loro stato indifferenziato per un periodo di tempo indefinito (Williams *et al.*, 1988). LIF appartiene alla famiglia della interleuchina-6 (IL-6) ed il meccanismo di segnale intracellulare da esso attivato è essenziale per il mantenimento della pluripotenza delle ESC (Matsuda *et al.*, 1999) (Figura 4).

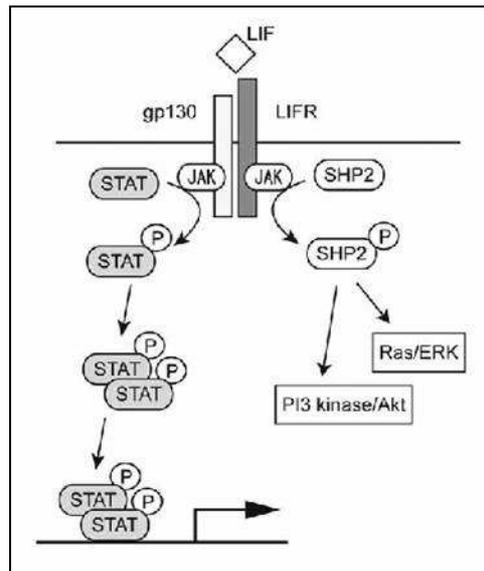


Figura 4. Meccanismo di segnale intracellulare attivato da LIF. Il recettore per LIF è un complesso eteromero formato dal gp130 e dal recettore LIF (LIFR) (Ernst e Jenkins, 2004). La tirosina chinasi JAK (*Janus Kinase*) lega il dominio intercellulare di questo complesso recettoriale nella sua forma inattiva. In seguito al legame con LIF, la chinasi JAK fosforila i residui di tirosina di gp130 e di LIFR. La fosforilazione del dominio intracellulare di gp130 e di LIFR recluta trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione STAT1 e STAT3 attraverso i loro domini SH2 (Stahl *et al.*, 1995). Le proteine STAT attivate formano omodimeri e/o eterodimeri e traslocano nel nucleo, dove svolgono la funzione di fattori di trascrizione (Auernhammer e Melmed, 2000). La stimolazione di LIF attiva anche altre vie metaboliche di segnale. STAT3 è importante per il mantenimento della pluripotenza delle ESC (Matsuda *et al.*, 1999).

1.1.2 Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte sono cellule indifferenziate multipotenti caratterizzate da un continuo *self-renewal* e sono localizzate, insieme alle cellule specializzate tipiche di un tessuto, all'interno del tessuto o di un organo in età post-natale (Kuci *et al.*, 2009). Le cellule staminali mesenchimali dello stroma del midollo osseo (*mesenchymal stem cells*, MSC) rappresentano la prima popolazione staminale adulta isolata ed identificata (Friedenstein *et al.*, 1970; Friedenstein *et al.*, 1976). In seguito alle scoperte di Friedenstein, sono state identificate differenti popolazioni stromali midollari con caratteristiche simili ma non identiche a quelle descritte originariamente.

a) Cellule staminali mesenchimali (MSC)

Le MSC sono cellule indifferenziate multipotenti e rappresentano una popolazione eterogenea che in coltura *ex vivo* aderiscono alla plastica, formano piccole colonie di cellule fibroblastoidi (*colony forming unit-fibroblast-CFU-F*). Sono in grado di autorinnovarsi e sono caratterizzate da una elevata capacità multidifferenziativa in senso osseo, adiposo, cartilagineo e muscolare (Figura 5).

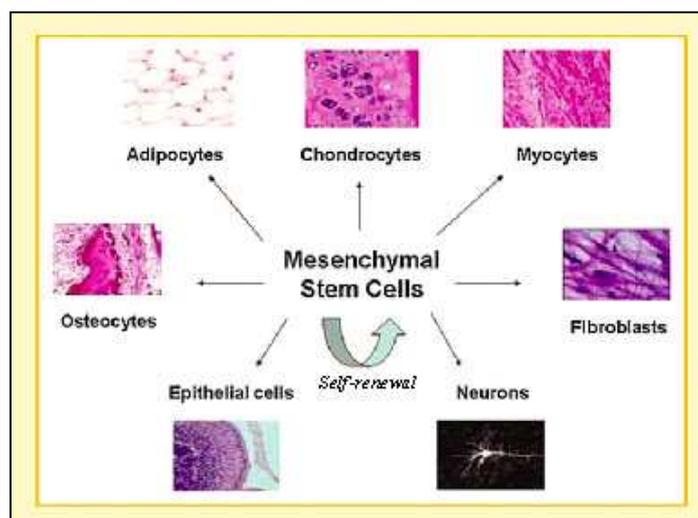


Figura 5. Capacità di autorinnovamento e multidifferenziativa delle MSC.

Come definito dalla Società Internazionale per la Terapia Cellulare (ICT) (Dominici *et al.*, 2006), presentano una elevata espressione ($\geq 95\%$) dei marcatori CD105, CD73, CD90 e bassa espressione ($\leq 2\%$) degli antigeni CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 e HLA-DR. Studi *in vitro* ed *in vivo* hanno inoltre dimostrato che sono dotate di *proprietà immunomodulatorie* (Le Blanc e Ringden, 2005; Nauta e Fibbe, 2007): agiscono infatti mediante a) soppressione dell'attivazione e della proliferazione delle cellule T; b) inibizione del differenziamento, della maturazione e della funzionalità delle cellule dendritiche; c) controllo del differenziamento e dell'attivazione delle cellule B; d) soppressione della proliferazione delle cellule *natural killer* (NK).

Gli effetti immunomodulatori delle MSC sono mediati da fattori, quali HGF (*hepatocyte growth factor*), IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*), PGE2 (*prostaglandin E2*), TGF- β (*transforming growth factor β*) e IFN- γ (interferon γ) (Figura 6).

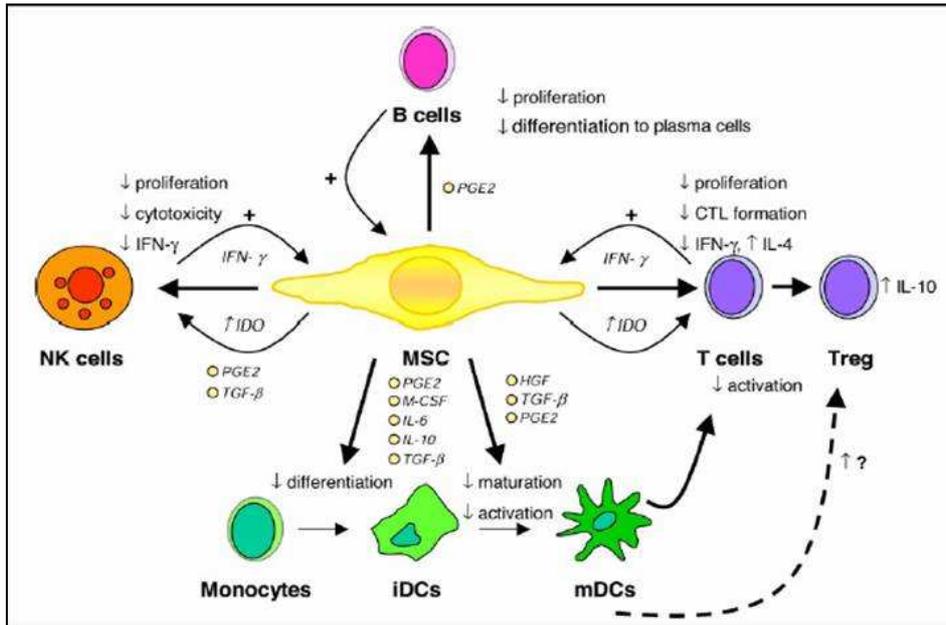


Figura 6. Proprietà immunomodulatorie delle MSC.

Grazie alle loro proprietà immunosoppressive, le MSC sono considerate una potenziale terapia cellulare per la prevenzione del rigetto di trapianto.

Le proprietà e la funzionalità delle MSC dipendono dalle caratteristiche del microambiente o *nicchia* (Figura 7), all'interno della quale si ancorano a cellule di supporto mediante proteine di giunzione e di adesione rappresentate dalle *connesine* e dalle *caderine* (Perez-Moreno *et al.*, 2003) e preservano il loro stato indifferenziato (Spradling *et al.*, 2001; Estes *et al.*, 2004). E' riportato che in seguito a particolari stimoli quale un danno tessutale, la cellula staminale migra dalla sua nicchia nel sangue fino a raggiungere il sito in cui viene reclutata per il processo di rigenerazione tessutale (*homing*). La presenza sulla loro superficie di specifici recettori di chemochine, ad esempio il recettore CXCR4 per l'SDF (*stromal cell-derived factor*)-1 α , ne consente la migrazione specifica al sito di reclutamento (Kolf *et al.*, 2007).

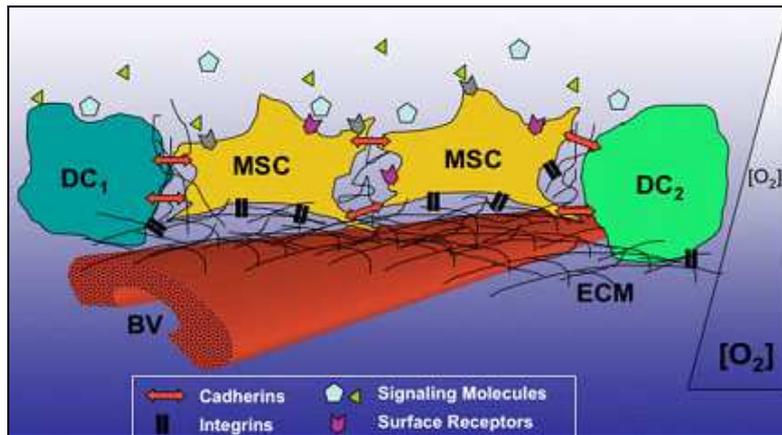


Figura 7. Nicchia delle cellule staminali mesenchimali. Le MSC sono rappresentate all'interno della componente perivascolare della loro nicchia (BV: blood vessel), e interagiscono (1) con diverse altre cellule differenziate (DC) mediante molecole di adesione, quali le caderine; (2) con la matrice extracellulare (ECM), depositata dalle cellule della nicchia, mediante recettori per integrine; (3) con molecole di segnale, quali fattori autocrini, paracrini, endocrini. Le MSC presenti nella nicchia del midollo osseo sono associate ad ipossia (Kolf *et al.*, 2007).

Per anni il midollo osseo ha rappresentato l'esclusiva fonte di cellule staminali ematopoietiche e di MSC multipotenti. Essendo la procedura estrattiva altamente invasiva per il donatore e la resa cellulare estremamente variabile e dipendente dall'età del soggetto (Nishida *et al.*, 1999; Mueller e Glowacki, 2001; Stenderup *et al.*, 2003), nell'ultimo decennio sono state oggetto di studio fonti alternative quali il sangue periferico, il cordone ombelicale (Rubinstein *et al.*, 1993), il tessuto adiposo (Zuk *et al.*, 2002) e la placenta (Kern *et al.*, 2006). L'interesse nei confronti delle cellule staminali mesenchimali è cresciuto rapidamente nel corso degli anni e numerose applicazioni nel campo della medicina rigenerativa sono state proposte per il recupero di danni strutturali e funzionali dei tessuti mesodermici, endodermici ed ectodermici (Pittenger *et al.*, 1999).

b) Cellule staminali circolanti nel sangue periferico

Alcuni studiosi suggeriscono che durante l'ontogenesi, ovvero durante lo sviluppo dell'organismo, cellule staminali ad alto, medio e basso grado di plasticità circolano ad alti livelli nel sangue periferico. Recentemente sono state identificate cellule ad attività staminale multipotente denominate PBMSC (*peripheral blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells*) (He *et al.*, 2007) che in colture *ex vivo* si sono mostrate aderenti alla plastica, di forma fibroblastoide organizzate in tipiche colonie fibroblastoidi CFU-F, simili a quelle derivate dal midollo osseo. La presenza di tali cellule risale in realtà al 1928 quando Maximow ha riconosciuto in colture di leucociti

cellule trasformate in simil PB CFU-F (*peripheral blood colony forming unit-fibroblast*) (Maximow, 1928). Le cellule fibroblastoidi ad attività clonogenica e proliferativa sono state identificate nel sangue periferico di diverse specie mammifere in età adulta quali guinea pig (Kuznetsov *et al.*, 2001), coniglio (Wan *et al.*, 2006), cane (Huss *et al.*, 2000), topo (Kuznetsov *et al.*, 2001), ratto (Wu *et al.*, 2003). Similmente a quelle midollari, le PB CFU-F (He *et al.*, 2007) risultano negative o presentano bassi livelli espressivi del marcatore CD34, marcatore tipicamente espresso dalla linea ematopoietica, il CD14, marcatore macrofagico e il CD45, antigene leucocitario. Inoltre, le PB CFU-F umane hanno bassi livelli di CD117 (c-Kit) e non esprimono l'antigene leucocitario umano HLA-DR, la proteina procoagulante fattore VIII, il CD31 e neurofilamenti, ma presentano fenotipi della linea mesenchimale, del tipo osteogenico e adipogenico. Esse esprimono inoltre il CD106 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e la proteina ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), che sono molecole di adesione utilizzate dalle cellule stromali per interagire con i progenitori ematopoietici del midollo. Inoltre, risultano negative per lo STRO-1, un marcatore comunemente utilizzato per purificare le popolazioni MSC da midollo osseo umano. Le PB CFU-F comprendono cellule positive al CD133 (Tondreau *et al.*, 2005), marcatore tipicamente espresso da cellule con potenzialità ematopoietica, endoteliale, o emoangioblasti (Loges *et al.*, 2004).

Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato la potenzialità differenziativa di tipo mesenchimale delle PB CFU-F, e la loro evoluzione in cellule simil-osteoblasti, -adipociti, -condrociti, -miotubi, -fibroblasti e -cellule reticolari (Kuznetsov *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003; Tondreau *et al.*, 2005). Tondreau e collaboratori (Tondreau *et al.*, 2005) hanno dimostrato che nella popolazione di PB CFU-F sono compresi cellule con potenzialità neuronale e gliale. Studi recenti più approfonditi suggeriscono che le PB CFU-F sono una popolazione eterogenea nella quale è possibile identificare progenitori cellulari e cellule a differenti stadi di staminalità (Jiang *et al.*, 2002). Questa riconosciuta capacità multipotente differenziativa le rende un potenziale candidato per l'applicazione nella terapia cellulare e nell'ingegneria tissutale.

Un particolare interesse per le possibilità immediate di impiego in campo clinico, è rivolto oggi alle cellule staminali fibroblastoidi circolanti che sono dotate della capacità di differenziarsi in cellule dell'osso, muscolo e cartilagine (PBMSC). Dopo un danno tissutale e/o il rilascio di specifici fattori di stress, è stato dimostrato che tali cellule vanno incontro ad un significativo incremento numerico, mediante un meccanismo

ancora sconosciuto. Studi sperimentali suggeriscono che tali cellule sono, in condizioni normali, accumulate a livello del midollo osseo o in sedi periferiche diffuse. In particolari condizioni fisiologiche o in seguito a danno tissutale, si attivano, migrano nel torrente sanguigno e stimolano il processo di rigenerazione del tessuto lesa. In seguito ad un danno tissutale, un processo infiammatorio o un'insufficienza metabolica, nell'organismo inizia una risposta riparativa che coinvolge elementi cellulari ed umorali (Davidson, 1992). I fibroblasti connettivali intervengono nella fase riparativa mediante produzione di proteine di matrice extracellulare, come fibre di collagene, e formazione di una cicatrice di tessuto connettivo. Essi agiscono anche nel rimodellamento del tessuto danneggiato, mantengono l'omeostasi tissutale, e assicurano la sopravvivenza a lungo-termine del tessuto connettivo. I fibroblasti che entrano e proliferano all'interno dei siti della ferita generalmente derivano dal reclutamento e migrazione di cellule da tessuti adiacenti. In normali circostanze, queste cellule sono quiescenti e rimangono distribuite nella matrice extracellulare (Morgan e Pledger, 1992; Dunphy, 1963). La presenza di un elevato numero di cellule fibroblastoidi in combinazione con l'entrata di cellule infiammatorie circolanti ha suggerito che i fibroblasti provengano dal sangue periferico e non esclusivamente dal tessuto connettivo adiacente (Davidson, 1992). Le cellule fibroblastoidi derivate dal sangue vengono denominate fibrociti, e sono state identificate in siti interni di tessuti danneggiati (Bucala *et al.*, 1994). Esse presentano caratteristiche leucocitarie e connettivali. Insieme alle cellule infiltranti di tipo infiammatorio, che agiscono nella prevenzione di infezione e digestione dei componenti del tessuto connettivo danneggiato, i fibrociti sembrano intervenire nelle fasi precoci della risposta fisiologica al danno tissutale. In situazioni quali ischemia o vasculopatia diabetica, la loro entrata nei siti del tessuto danneggiato potrebbe essere compromessa, contribuendo ad indebolire il riparo della ferita e alla formazione di una scarsa cicatrice. I fibrociti inoltre possono essere coinvolti in una varietà di processi patologici caratterizzati da eccessiva fibrosi o proliferazione di cellule di tessuto connettivo. Alcune evidenze sperimentali portano a considerare tali cellule derivanti dalla sottopopolazione dei monociti-macrofagi essendo positive per il CD14 (Abe *et al.*, 2001).

I monociti circolanti CD14⁺ derivano dalle cellule staminali ematopoietiche del midollo osseo e costituiscono il 5-10% dei globuli bianchi umani. Essi rappresentano una popolazione eterogenea per quanto riguarda i marcatori superficiali, la capacità fagocitaria e la capacità differenziativa, ma sono precursori *committed* in transito dal

midollo osseo verso i siti ultimi di attività (Gordon, 1995). I monociti circolanti sono in grado di differenziare in una varietà di fagociti, cellule dendritiche, osteoclasti, microglia nel sistema nervoso centrale e cellule Kupffer nel fegato. Inizialmente si riteneva che il potenziale differenziativo dei monociti fosse ristretto alle cellule con capacità fagocitaria. Tuttavia, è stato dimostrato che essi sono in grado di differenziare in vari altri tipi cellulari. La scoperta di una particolare popolazione cellulare primitiva, denominata MOMC (*monocyte-derived multipotential cells*), ha supportato il concetto di multipotenzialità dei monociti circolanti (Kuwana *et al.*, 2003). Le MOMC, precedentemente dette MOMP (*monocyte-derived mesenchymal progenitors*), costituiscono una popolazione cellulare umana con morfologia fibroblastoide e positive per il CD14, il CD45, il CD34 e il collagene di tipo I.

Dopo specifica induzione, esprimono geni e proteine specifiche dei tessuti osseo, adiposo, cartilagineo, muscolare scheletrico, cardiomiogenico, neuronale ed endoteliale (Seta e Kuwana, 2007) (Figura 8).

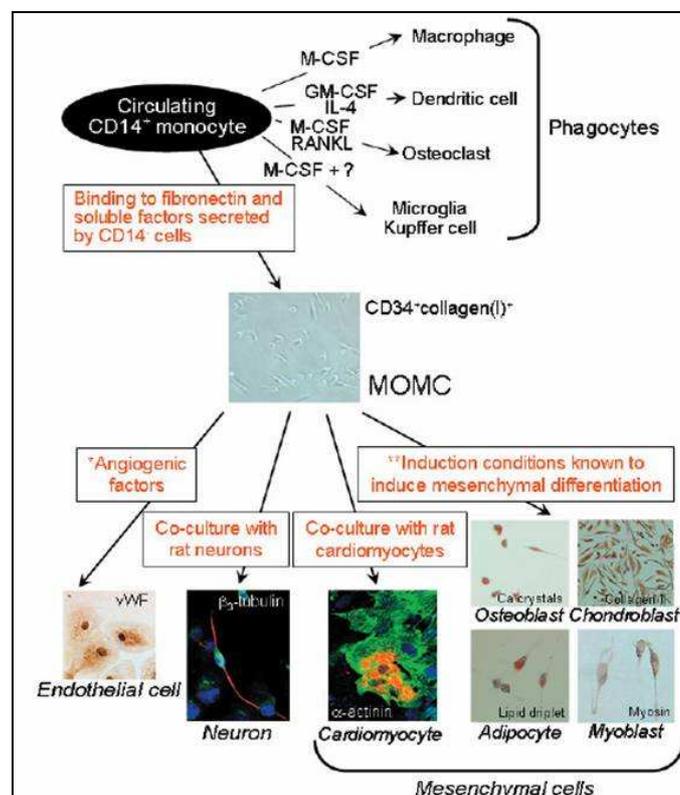


Figura 8. Capacità multidifferenziativa dei monociti circolanti CD14⁺ attraverso il differenziamento in MOMC.

Alcuni studi hanno suggerito che le cellule staminali ematopoietiche adulte (HSC) sono cellule plastiche che possono transdifferenziare in diversi tipi cellulari. Questo argomento ha suscitato una grande eccitazione nella comunità scientifica sulla possibilità di impiego delle HSC nella rigenerazione tessuto/organo specifica (es. infarto, danno epatico). Alcuni risultati di plasticità cellulare possono essere spiegati con il fenomeno della fusione cellulare (Terada *et al.*, 2002). E' stato dimostrato in modelli sperimentali che le HSC possono fondersi con cellule somatiche e le cellule derivanti acquisiscono marker di entrambe le cellule parenterali. Il fenomeno della fusione cellulare, comunque, appare essere raro e sembra avvenire preferenzialmente in cellule in cui la poliploidia è comunemente osservata (epatociti, cellule Purkenje, cellule muscolari scheletriche). Inoltre, la fusione cellulare come causa di transdifferenziamento è stata esclusa in numerosi studi pubblicati che hanno dimostrato la plasticità del midollo osseo, cellule staminali scheletriche satellite e neurali (Wurmser *et al.*, 2004). In alcune circostanze, le cellule vanno incontro a cambiamenti epigenetici causati da stimoli esterni che modulano l'espressione genica linea specifica.

Altra spiegazione al fenomeno, è che il midollo osseo possa originare in aggiunta alle cellule staminali ematopoietiche altre sottopopolazioni rare di cellule staminali tessuto specifiche (*tissue-committed stem cells*, TCSC) e forse cellule staminali più primitive di tipo pluripotente (PSC) che si accumulano nel midollo durante l'ontogenesi. In questa prospettiva, allora, il midollo osseo potrebbe contenere popolazioni eterogenee di cellule staminali a differenti livelli di differenziamento, dalle PSC alle TCSC. Queste cellule sono una "riserva mobile di cellule per il recupero di danni tissutali".

Il midollo si sviluppa relativamente tardi durante l'ontogenesi al tempo in cui il midollo fetale si sostituisce come organo ematopoietico al fegato fetale. Il processo di sviluppo stabilisce l'ematopoiesi nel midollo a partire dalla fine del secondo trimestre di gestazione e si realizza grazie all'espressione/secrezione da parte di fibroblasti e osteoblasti di SDF-1 che chemoattrae le HSC esprimenti lo specifico recettore CXCR4 (CXCR4⁺HSC) dal fegato al midollo (Zou *et al.*, 1998). L'asse SDF-1-CXCR4 è essenziale nella regolazione della colonizzazione del midollo da parte delle HSC durante l'ontogenesi e successivamente nella vita adulta attraverso l'*homing/retention* di tali cellule.

Kucia e collaboratori (Kucia *et al.*, 2005) suggeriscono che durante l'ontogenesi e la crescita rapida del corpo e/o espansione anche le cellule TCSC (es. per muscoli, neuroni, fegato, cuore, pancreas endocrino, epitelio tubulare renale) e forse precursori di

cellule staminali ancora più primitive del tipo PSC per varie TCSC, in aggiunta alle HSC, circolano ad alti livelli nel sangue periferico e si accumulano gradualmente nel midollo dove trovano il microambiente ideale alla loro sopravvivenza (Ratajczak *et al.*, 2004 a). Queste cellule, similmente alle HSC, esprimono il CXCR4 e rispondono ad un gradiente di SDF-1 (Ratajczak *et al.*, 2003). Si intuisce che l'asse SDF-1-CXCR4 gioca un ruolo nella ritenzione, nel trafficking e nell'*homing* di queste cellule.

Ragionevoli evidenze hanno mostrato che il CXCR4 è espresso non solo sulle HSC ma anche su tutto lo spettro di cellule staminali comprendente le PSC e le TCSC (Ratajczak *et al.*, 2004 a). Il CXCR4 non è solo espresso ma è anche funzionale; infatti tutte le cellule CXCR4⁺ rispondono allo stimolo chemotattico di SDF-1. A sostegno di tale ipotesi, embrioni SDF-1 e CXCR4 knockout oltre ad evidenziare una colonizzazione deficitaria del BM da parte delle HSC mostrano anche difetti diversi a livello del cuore, muscolo, cervello, e sviluppo dei grandi vasi (Zou *et al.*, 1998) suggerendo un ruolo essenziale dell'asse SDF-1-CXCR4 nel trafficking di cellule staminali durante l'organogenesi. Le cellule staminali, quindi, potrebbero viaggiare fra nicchie staminali e circolare nel sangue periferico, inoltre il BM potrebbe essere visto non solo come l'*Home* delle CXCR4⁺HSC ma anche una riserva nascosta di cellule CXCR4⁺TCSC come dimostrato dall'analisi di espressione su popolazioni arricchite di TCSC isolate in modo chemotattico da BM (BMMNC) da aspirati midollari di mRNA tessuto specifici oltre che per fattori di trascrizione caratteristici delle cellule staminali embrionali/pluripotenti quali ad esempio Oct-4, Nanog, Rex-1, il che suggerisce che forse PSC potrebbero essere presenti tra le cellule arricchite di TCSC (Kucia *et al.*, 2005).

Kucia e collaboratori hanno osservato che il numero di cellule CXCR4⁺TCSC nel sangue periferico può essere aumentato dalla somministrazione di agenti simili a quelli impiegati per la mobilitazione di HSC (es. G-CSF) (Ratajczak *et al.*, 2004 b) o stimolati da fattori di stress associati ad un danno organo/tessuto specifico (es. infarto) (Kucia *et al.*, 2004). Così, la mobilitazione farmacologica potrebbe essere vista non solo come un mezzo per l'aumento di HSC nel sangue periferico ma anche come un processo che mobilita le cellule TCSC nel circolo ematico. Un aumento di tali cellule nel sangue periferico durante un danno tessutale supporta l'ipotesi che esse possano giocare un ruolo importante nella riparazione tessutale. Quindi, è verosimile che i processi di rigenerazione locali coinvolgano non solo il reclutamento di progenitori presenti in sede ma recluti anche TCSC specifiche per l'organo danneggiato che risiedono in nicchie

distanti dello stesso tessuto. Dal momento che la rigenerazione degli organi danneggiati coinvolge l'espansione delle cellule parenchimali e allo stesso modo la sua neovascolarizzazione (Hess *et al.*, 2003), non sorprende che durante i processi rigenerativi si possa riscontrare un aumento di TCSC circolanti per l'endotelio (Ratajczak *et al.*, 2004 a).

2. Applicazioni delle cellule staminali nell'ingegneria tissutale

In seguito a traumi o patologie, molti tessuti ed organi del nostro organismo non sono più in grado di svolgere la loro funzione dal punto di vista strutturale e metabolico. Fino a poco tempo fa l'uso di protesi rappresentava l'unica possibilità per far fronte a queste condizioni patologiche. Tuttavia l'intervento richiesto per il loro inserimento può essere compromesso dall'insorgere di un'infezione incurabile. A tal proposito, per la ricostituzione di tessuti ed organi danneggiati sono stati raggiunti importanti progressi nel campo dei trapianti. Questo tipo di trattamento è però limitato dalla scarsa disponibilità di organi, dal problema del rischio di rigetto e dalla continua necessità di assumere farmaci immunosoppressori (Terada *et al.*, 2000).

Come alternativa al trapianto, la medicina rigenerativa propone strategie alternative per la sostituzione o il riparo di un tessuto danneggiato. Questa scienza coinvolge discipline diverse e comprende la terapia cellulare e l'ingegneria tissutale (Guillot *et al.*, 2007). In questi ultimi anni, grande attenzione è stata rivolta allo sviluppo dell'ingegneria tissutale, che sta evolvendo sempre più rapidamente. Con il termine "ingegneria tissutale" (*tissue engineering*), definito nel 1988 dai membri della National Science Foundation (NSF), viene indicato un campo multidisciplinare che applica i principi della biologia e dell'ingegneria per lo sviluppo di sostituti biologici che ripristinano, mantengono o migliorano la funzionalità tissutale (Langer e Vacanti, 1993).

Lo scopo di questa scienza è generare tessuti funzionali, dotati di grandezza, forma e funzionalità tipiche di quelli nativi e adatti all'impianto *in vivo* (Eschenhagen e Zimmermann, 2005). In generale, un costrutto di ingegneria dei tessuti è formato dalla componente cellulare e da una struttura di base con funzione di supporto (*scaffold*) costituita da una componente artificiale, di tipo polimerico oppure naturale. Le cellule, grazie alla produzione di matrice extracellulare, favoriscono l'integrazione nel sito di impianto in presenza o meno di specifici fattori di crescita ed in combinazione con cellule staminali autologhe (Suh, 2000) (Figura 9).

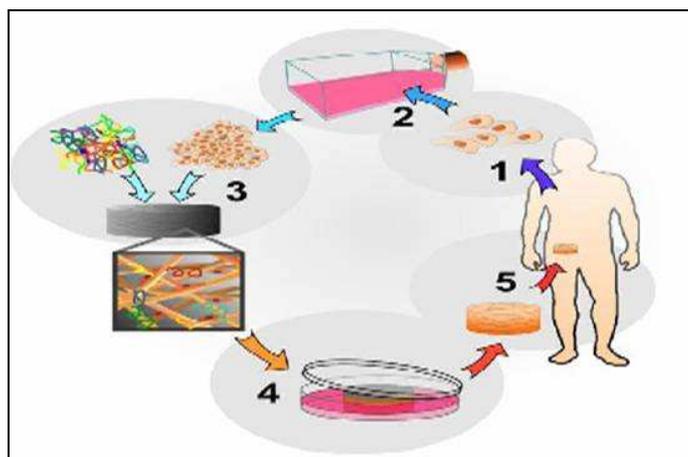


Figura 9. Meccanismo di ingegneria tissutale. 1: espianto delle cellule dal paziente/donatore, 2: espansione *in vitro*, 3: realizzazione del costrutto cellule/matrice/fattori di crescita, 4: coltura delle cellule nella matrice, 5: reimpianto del costrutto nel paziente.

2.1 Terapia staminale in campo cardiologico

Le malattie cardiovascolari rappresentano un importante problema sanitario a livello mondiale e costituiscono la prima causa di morte nella popolazione dei paesi occidentali, nonostante i progressi ottenuti nel campo della medicina cardiovascolare (Yoon *et al.*, 2005). Esse comprendono tutte le patologie a carico del cuore e dei vasi sanguigni, causate non solo dall'ischemia (cardiopatia ischemica) ma anche da eventi non ischemici, quali le miocarditi, l'ipertensione, il diabete, le aritmie, le malattie valvolari, l'ipotiroidismo e la cardiotoxicità indotta da farmaci (Burchfield e Dimmeler, 2008). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, le malattie cardiovascolari, che interessano per la maggior parte il funzionamento delle valvole cardiache, causano circa il 30% della mortalità mondiale. Secondo una recente stima, il numero dei pazienti che necessitano di un intervento sostitutivo valvolare cardiaco è in crescente aumento e salirà a circa 850.000 nel 2050 (Yacoub e Takkenberg, 2005).

2.1.1 Valvulopatie

a) Stenosi valvolare aortica

Sebbene le valvole aortiche possano diventare stenotiche per cause differenti, nella maggior parte dei casi la stenosi è dovuta a malformazioni congenite o degenerazione calcifica (Dare *et al.*, 1993). I mutamenti degenerativi che si verificano nel corpo umano coinvolgono anche valvola aortica e radice. L'età determina un ispessimento delle fibre

di collagene a livello delle cuspidi. Tali fibre sembrano anche perdere il loro orientamento. Si verifica inoltre un aumento delle fibre elastiche dovuto comunque più alla frammentazione delle stesse che ad un aumento effettivo di numero (Fleg, 1986). Altri cambiamenti correlati all'età includono un accumulo di prodotti di degradazione cellulare, come lipidi e calcio. Questo è dovuto probabilmente ad un insufficiente meccanismo "scavenger" microvascolare nelle cuspidi valvolari (Kim *et al.*, 1976). Il risultato è un aumento del grado di calcificazione, particolarmente nelle zone di maggiore stress meccanico per i lembi, che sono le zone di ancoraggio. Una volta iniziato il processo di calcificazione a livello della linea di ancoraggio del lembo, la distribuzione dello stress sulle rimanenti parti di cuspidi cambia e la calcificazione progredisce di solito lungo la linea di coaptazione. Questi cambiamenti correlati all'età risultano nell'ispessimento della valvola e nella riduzione di distensibilità dei lembi. Come possibile meccanismo di calcificazione nelle bicuspidie è stato proposto il trauma meccanico (Edwards, 1961). La lunghezza differente dei margini liberi dei due lembi ne determina un anomalo contatto, che produce tensione o trauma meccanico. Questo risulta in un focale ispessimento fibroso che causa calcificazione distrofica. Quest'ipotesi spiega perché la stenosi è il risultato di un trauma dei lembi ma non spiega perché alcune valvole aortiche bicuspidi funzionino efficacemente senza creare problemi indefinitamente.

La calcificazione coinvolge l'intera superficie del lembo. La storia naturale della stenosi aortica nell'adulto è caratterizzata da un periodo prolungato di latenza in cui morbilità e mortalità sono molto basse (Bonow *et al.*, 1998). La terapia medica durante questo intervallo di tempo consiste principalmente nella riduzione del postcarico. La comparsa di sintomi, quali angina, sincope o scompenso cardiaco, identifica un momento critico nella storia naturale della stenosi aortica, per cui risulta necessario intervenire chirurgicamente.

b) Insufficienza valvolare aortica

L'insufficienza aortica può interessare la valvola, l'aorta ascendente o entrambe (Olson *et al.*, 1984). Le più comuni cause di insufficienza aortica sono la dilatazione della radice aortica, la patologia post-infiammatoria o reumatica, l'incompleta chiusura di una valvola congenitamente bicuspidale e l'endocardite infettiva. Nella febbre reumatica, le cuspidi valvolari aortiche diventano fibrose e tendono a retrarsi. Questo causa la mancata coaptazione dei lembi durante la diastole e conseguentemente si avrà un rigurgito centrale. La fusione delle commissure può inoltre impedire l'apertura della valvola, determinando stenosi associata a rigurgito. Altre cause primarie di rigurgito aortico sono l'incompleta chiusura e/o il prollasso di un lembo di valvola bicuspidale.

Cause meno comuni includono traumi, rottura di una valvola congenitamente fenestrata e rigurgito associato a patologie sistemiche come il lupus eritematoso, l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante, la sifilide e la malattia di Takayasu o il rigurgito associato alla malattia di Chron o di Whipple (Braunwald, 1997).

L'incidenza di pazienti sottoposti a chirurgia per rigurgito aortico puro, secondario a patologia della radice aortica con successiva dilatazione è andata crescendo negli anni e oggi ammonta a circa il 50% dei casi (Dare *et al.*, 1993). Cambiamenti correlati all'età che interessano la radice aortica e l'aorta ascendente includono accumulo di sostanza *ground*, frammentazione delle fibre elastiche, graduale sostituzione di cellule muscolari lisce con collagene e medionecrosi focale, causando un graduale irrigidimento della radice aortica che tende a dilatarsi con l'età.

Altre condizioni patologiche, associate a dilatazione della radice aortica, includono l'ipertensione (Waller *et al.*, 1982), o altre patologie associate ad anomalie del connettivo come l'osteogenesi imperfetta (Stein e Kloster, 1977). Tutte queste condizioni non colpiscono inizialmente la valvola aortica ma la dilatazione della radice aortica e il conseguente rigurgito aortico centrale può secondariamente coinvolgere i lembi valvolari che diventano spessi e retratti, peggiorando l'esistente grado di rigurgito.

La comparsa di disfunzione ventricolare sinistra è un marker precoce dei conseguenti sintomi, come angina, dispnea e scompenso cardiaco. Come in una stenosi aortica, una volta che il paziente diventa sintomatico, la condizione spesso deteriora rapidamente e la sopravvivenza dei pazienti con scompenso cardiaco generalmente non supera i due anni. Si può verificare morte improvvisa, anche se non frequentemente e comunque si ha in pazienti precedentemente sintomatici (Braunwald, 1997). Le indicazioni attuali per

la chirurgia sono insufficienza valvolare acuta, insufficienza valvolare severa, associate o no a sintomatologia o a ventricolo sinistro dilatato, insufficienza ventricolare sinistra e pazienti sintomatici.

2.1.2 Terapia delle valvulopatie

Le terapie farmacologiche sviluppate per il trattamento delle patologie cardiache sono state indirizzate verso un miglioramento della qualità di vita del paziente. Tuttavia, nonostante la disponibilità di farmaci limitanti la progressione della malattia, le terapie attuali o le procedure d'intervento non sono in grado di permettere la sostituzione del tessuto (Mann e Bristow, 2005).

Per le patologie cardiovascolari non esistono cure efficaci in grado di ripristinare il normale funzionamento cardiaco ed è quindi necessario sviluppare terapie alternative.

2.1.2.1 Terapia cellulare

Per migliorare il recupero della funzionalità cardiaca è stato proposto il trapianto cellulare mediante l'utilizzo di cellule *committed*, cioè mioblasti scheletrici e cardiomiociti. Più recentemente, in seguito all'avvento del nuovo dogma che considera il cuore un organo non postmitotico e con capacità rigenerativa, nella terapia cellulare cardiaca è stato introdotto l'utilizzo delle cellule staminali multipotenti.

a) Cellule staminali da midollo osseo

Gli studi clinici sulla potenzialità della terapia cellulare cardiaca hanno coinvolto maggiormente le cellule derivate da midollo osseo, che comprendono cellule staminali multipotenti e progenitori (Krause *et al.*, 2001), incluse le cellule staminali mesenchimali (MSC), le cellule progenitrici endoteliali (EPC) e le cellule staminali ematopoietiche HSC (*hematopoietic stem cells*). La possibilità del loro isolamento dal paziente stesso, e la loro successiva espansione, permettono di evitare la comparsa del rischio di rigetto (Yu *et al.*, 2009), oltre ad offrire il vantaggio dell'assenza di problemi di tipo etico.

b) Cellule staminali mesenchimali (MSC)

L'interesse verso l'utilizzo delle MSC nel riparo cardiaco è stato stimolato dai promettenti risultati dimostranti il loro differenziamento in cardiomiociti (Bittira *et al.*, 2002; Makino *et al.*, 1999). Studi in modelli animali hanno dimostrato che le MSC

derivate dal midollo osseo (*bone marrow mesenchymal stem cells*, BM-MSC) migrano verso il cuore e promuovono la rigenerazione del miocardio infartuato (Hattan *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 2004), probabilmente mediante un effetto paracrino (Gnecchi *et al.*, 2005; Mangi *et al.*, 2003).

Il modello animale scelto di frequente per gli studi di terapia cardiaca cellulare è quello porcino, essendo la grandezza del suo cuore simile a quella dell'organo umano (Pittenger *et al.*, 2002). Questa specie animale presenta somiglianze con l'uomo anche dal punto di vista immunologico e fisiologico, e costituisce una delle migliori fonti di organi per pazienti umani grazie alla struttura e alla funzione dei suoi organi simili a quelli umani. La sua vita media di oltre 20 anni consente inoltre di condurre studi a lungo-termini. Il modello porcino fornisce dunque diversi vantaggi rispetto ad altre specie ed è utile in vari campi della ricerca biomedica, compreso quello delle malattie cardiovascolari (Cheng e Xiao, 2009).

Le cellule miogeniche derivate dalle MSC (Moscoso *et al.*, 2005) e le MSC autologhe indifferenziate (Shake *et al.*, 2002) sono state utilizzate per il riparo cardiaco dopo infarto o ischemia nel modello porcino. Le cellule sono state iniettate direttamente in prossimità o all'interno del miocardio danneggiato da un evento di ischemia acuta o cronica, e gli effetti risultanti da questo intervento sono stati determinati dopo diverse settimane. In tutti i casi, è stata dimostrata la rigenerazione miocardica accompagnata dalla ricostituzione del miocardio correlata con il miglioramento della funzionalità ventricolare e la ricomparsa dell'attività motoria della parete (Moscoso *et al.*, 2005; Shake *et al.*, 2002). Inoltre, il cotrapianto di MSC umane e cardiomiociti fetali umani in maiali postinfartuati, ha permesso di migliorare la prestazione cardiaca in maniera più intensa rispetto al trapianto delle sole MSC (Min *et al.*, 2002). La formazione di miociti e vasi coronarici è stata osservata anche in ratti dopo una lesione da freddo (*cryoinjury*), e impianto di MSC (Onishchenko *et al.*, 2004). Tuttavia, l'iniezione intracoronarica di cellule MSC dopo infarto, induce il loro differenziamento in fibroblasti a livello della regione cicatriziale, e induce la rigenerazione di miociti nella regione non danneggiata della parete ventricolare (Vulliet *et al.*, 2004). Di rilevante importanza è che, in assenza di danno, le MSC si innestano nel miocardio ma rimangono in uno stato vitale quiescente e non partecipano al turnover fisiologico delle cellule miocitiche, muscolari lisce vascolari ed endoteliali. Perciò, lo sviluppo delle MSC *in vivo* è condizionato in maniera significativa dal microambiente.

Le BM-MSc sono state ampiamente studiate per possibili applicazioni di ingegneria delle valvole cardiache e per il riparo del miocardio danneggiato. Nel 2005 Knight e collaboratori (Knight *et al.*, 2005) hanno dimostrato che le cellule progenitrici mesenchimali umane sono in grado di ripopolare una matrice valvolare acellulare porcina, mentre, un anno più tardi, Bin e collaboratori (Bin *et al.*, 2006) hanno dimostrato che le BM-MSc umane, seminate su valvole aortiche o polmonari decellularizzate trapiantate nell'uomo, possono differenziare *in vitro* in cellule endoteliali. Inoltre, le cellule adulte BM-MSc sono state iniettate con buoni risultati nella regione cardiaca infartuata di ratto utilizzando scaffolds di collagene (Xiang *et al.*, 2006) e, più recentemente, le MSC sono state iniettate in un agnello su uno scaffold decellularizzato xenogenico, dimostrando un soddisfacente aumento dell'emodinamica (Vincentelli *et al.*, 2007). Le MSC sono state anche proposte come nuova fonte cellulare per l'ingegneria dei vasi sanguigni, come riportato recentemente da Gong e Niklason, i quali hanno dimostrato il loro differenziamento in cellule muscolari lisce utilizzando uno scaffold biodegradabile ed un sistema biomimetico di perfusione (Gong e Niklason, 2008).

In ambito clinico, alcuni studi di fase 1 e fase 2 hanno dimostrato la fattibilità e i potenziali benefici clinici della terapia cellulare nelle sindromi coronariche acute e croniche (Wollert e Drexler, 2005). I risultati ottenuti nell'uomo suggeriscono che una rigenerazione miocardica e una neoangiogenesi possano conseguire quale effetto diretto o indiretto dell'iniezione intracoronarica o intramiocardica (epicardica o endocardica) di cellule staminali derivate dal midollo osseo.

c) Cellule progenitrici endoteliali (EPC)

Il midollo osseo è anche una sorgente di progenitori delle cellule endoteliali che possono essere mobilizzate e che, se localizzate nel sito ischemico, sono in grado di contribuire alla formazione di nuovi vasi (Asahara *et al.*, 1997). Angioblasti derivanti dal midollo osseo, da esso mobilizzati mediante iniezione sottocutanea di G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), danno luogo nel cuore infartuato, ad un processo di neoangiogenesi in grado di prevenire l'apoptosi dei cardiomiociti e la deposizione del collagene che forma la cicatrice, contribuendo in questo modo a migliorare la funzione cardiaca (Kocher *et al.*, 2001).

Kawamoto e collaboratori (Kawamoto *et al.*, 2001) sostengono che, in ratti con ischemia miocardica, la somministrazione endovenosa di EPC espanse *ex vivo*

favorisce il mantenimento della funzionalità ventricolare sinistra. Inoltre, essi hanno dimostrato il potenziale terapeutico di EPC autologhe trapiantate dopo un'ischemia miocardica cronica, concludendo che le EPC permettono di migliorare la funzionalità del ventricolo sinistro, sebbene in piccola parte (Kawamoto *et al.*, 2003).

d) Cellule staminali ematopoietiche (HSC)

Studi compiuti dal gruppo del Prof. Anversa (Orlic *et al.*, 2001 a; Orlic *et al.*, 2001 b) sull'applicazione delle cellule staminali nel trattamento delle patologie cardiache umane hanno portato all'isolamento delle cellule HSC, una sottopopolazione di cellule multipotenti purificate, che risultano negative ai marker della linea ematopoietica (Lin⁻) e positive al recettore dello *stem cell factor* (c-Kit⁺). Trapiantate nel cuore di un modello murino in cui è stato indotto un infarto sperimentale in seguito a legatura di una coronaria, esse sono in grado di differenziare in endotelio vascolare, cellule muscolari lisce e cardiomiociti. Nove giorni dopo il trapianto, queste cellule e la loro progenie si ritrovano nell'area infartuata e differenziano in più linee cellulari. I cardiomiociti derivanti dal midollo osseo esprimono la catena pesante della miosina e fattori di trascrizione cardiaci (MEF2, GATA-4, Nkx2.5) attivi durante le fasi precoci dello sviluppo cardiaco. Questo coincide con la perdita dell'espressione di c-Kit confermando che i nuovi cardiomiociti rappresentano cellule mature. Istologicamente sono simili ai cardiomiociti neonatali ed esprimono la connessina 43, indice di accoppiamento elettromeccanico.

e) Very Small Embryonic-like Stem Cells (VSELs)

Questa nuova sottopopolazione di cellule di midollo osseo, positive per Sca-1 e negative per i marcatori della linea ematopoietica, definite quindi dal fenotipo Sca-1⁺/Lin⁻/CD45, è in grado di esprimere i marcatori cardiaci e differenziare in cardiomiociti *in vitro*, migliorare la funzionalità del ventricolo sinistro ed alleviare l'ipertrofia miocitica dopo infarto miocardico *in vivo* in un modello animale murino (Dawn *et al.*, 2008).

Il riconoscimento che le cellule derivate dal midollo osseo sono in grado di riparare il cuore danneggiato ha cambiato profondamente il futuro della ricerca cardiovascolare e della cardiologia clinica (Leri *et al.*, 2005). L'entusiasmo creato dai diversi studi che riportano la rigenerazione miocardica dopo iniezione di tali cellule ha indirizzato i cardiologi verso il loro utilizzo nella terapia dello scompenso cardiaco del cuore umano (Strauer *et al.*, 2002). Data la necessità di curare i pazienti malati, i clinici stanno

prendendo sempre più in considerazione l'utilizzo della terapia cellulare per la rigenerazione cardiaca. D'altra parte, la comunità scientifica si mostra cauta data la necessità di acquisire maggiori conoscenze sui meccanismi coinvolti nel riparo cardiaco prima di poter introdurre questi protocolli nella pratica clinica. Allo stato attuale (Scacciatella e Marra, 2007) è ancora da chiarire a) quali siano i pazienti che maggiormente possono beneficiare di tale trattamento, b) quali siano le migliori modalità di trapianto cellulare, c) quali siano le migliori linee cellulari da utilizzare a scopo terapeutico, d) quale sia il momento migliore per l'inoculazione dall'evento acuto.

f) Cellule staminali mobilitate da midollo osseo

Le cellule staminali mobilitate da midollo osseo rappresentano una popolazione piuttosto eterogenea, che comprende cellule EPC e cellule HSC. Apparentemente, da midollo osseo non si verifica mobilitazione di cellule MSC (Noort *et al.*, 2009).

Il trattamento con GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) è stato clinicamente applicato per diversi anni con lo scopo di ottenere innesti per procedure di trapianto di cellule ematopoietiche (Gianni *et al.*, 1989), poiché aumenta i livelli di cellule CD34 positive nel sangue periferico. Mediante questo tipo di trattamento, nel sangue periferico vengono aumentati anche i livelli di cellule EPC derivate dal midollo osseo, confermando in tal modo la stretta relazione esistente tra le cellule EPC e le cellule HSC.

La mobilitazione cellulare è parte integrante della risposta flogistica che segue un danno miocardico acuto (Frangogiannis *et al.*, 2002). Shintani e collaboratori (Shintani *et al.*, 2001) hanno dimostrato per la prima volta nell'uomo la mobilitazione di progenitori delle cellule endoteliali e di cellule mononucleari CD34 positive durante un evento di ischemia miocardica acuta, correlandola con il significativo aumento dei livelli plasmatici del fattore di crescita vascolare endoteliale (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). Questo studio ha fornito le premesse scientifiche necessarie per i futuri tentativi di incrementare gli stimoli citochinici con lo scopo di potenziare la mobilitazione cellulare. Le citochine sono in grado di agire come mediatori biologici a livello delle cellule cardiache. In seguito ad infarto del miocardio è stato rilevato un aumento di interleuchina (IL)-1 α , fattore di necrosi tumorale- α , IL-6 e del relativo recettore di membrana, gp130, nella forma solubile (Aukrust *et al.*, 1999). In particolare, la riorganizzazione che segue lo stress ipossico aumenta la produzione di

RNA messaggero (mRNA) di IL-6 e cardiotrofina-1 (Hishinuma *et al.*, 1999). Entrambe queste citochine si legano con il recettore di membrana gp130, presente sui cardiomiociti, attivando le vie di trasduzione del segnale JAK/STAT e MAP kinasi, che portano i cardiomiociti adulti all'ipertrofia. La cardiotrofina-1 dà origine, nei cardiomiociti, ad un'organizzazione sarcomerica tipica del tessuto ipertrofico e all'espressione di geni fetali (Pennica *et al.*, 1995). La liberazione di citochine a seguito del fenomeno ischemico potrebbe quindi, secondo un'ipotesi ancora non confermata, intervenire a livello delle cellule staminali promuovendone il differenziamento in senso cardiomiocitario favorendo l'espressione normalmente silente di geni embrionali legati allo sviluppo cardiaco.

La più importante esperienza riguardante l'effetto rigenerativo in zone infartuate da parte di cellule staminali midollari mobilizzate attraverso stimoli citochinici, è quella riportata da Orlic e collaboratori (Orlic *et al.*, 2001 c). Per primi hanno utilizzato una terapia combinata con i fattori SCF e G-CSF in un modello murino di infarto miocardico acuto indotto dalla legatura di una coronaria dimostrando, dopo appena 27 giorni, un significativo miglioramento nel rimodellamento ventricolare, nella funzione cardiaca e nella sopravvivenza degli animali con 5 giorni di trattamento. L'esito positivo è stato associato ad una significativa cardiomiogenesi derivata dal midollo osseo. Questi risultati, comunque, non sono stati riprodotti in un altro studio in cui G-CSF e SCF sono stati somministrati in un'unica dose 4 ore dopo un infarto sperimentale in primati (Norol *et al.*, 2003).

La precisa cronologia, la cinetica ed i fattori stimolanti il midollo osseo rimangono oggetto di intensa ricerca; tuttavia, diversi fattori sono stati evidenziati come cruciali nella mobilizzazione nella circolazione periferica delle cellule staminali EPC derivanti dal midollo, quali VEGF, SDF-1 (*stromal-derived factor 1*), angiopoietina-1, PlGF (*placental growth factor*), eritropoietina, statine ed estrogeni (Dimmeler *et al.*, 2005), ma gli aumenti funzionali osservati possono non dipendere completamente dalla mobilizzazione delle EPC e possono, almeno in parte, essere spiegati dagli effetti proangiogenici o antiapoptotici dei fattori di crescita. L'utilizzo di cellule staminali mobilizzate nel trattamento di infarto miocardico acuto ha dato risultati promettenti, tuttavia sono stati riportati dati contraddittori riguardanti il beneficio sulla funzionalità cardiaca (Matsubara, 2004). Il rilascio in circolo di cellule staminali dall'ambiente del midollo osseo rimane ancora poco conosciuto. Le metalloproteasi di matrice (MMP) potrebbero promuovere il legame del ligando c-kit a cellule progenitrici c-kit positive,

successivamente mobilizzate in circolo. Infatti, la mobilizzazione di EPC indotta da VEGF risultava significativamente ridotta in topi MMP9^{-/-} o in seguito a somministrazione di un inibitore delle MMP. Per poter confermare e fare chiarezza su questi meccanismi sono comunque necessari ulteriori studi (Rafii e Lyden, 2003).

2.1.2.2 Protesi valvolari cardiache

Le malattie valvolari cardiache costituiscono una delle principali cause di mortalità mondiale, e sono responsabili ogni anno di oltre 15.000 morti negli Stati Uniti (Thom *et al.*, 2006). Nel mondo vengono effettuati quasi 300.000 interventi di chirurgia valvolare cardiaca annuali (Schoen e Levy, 2005), con lo scopo di riparare o sostituire i dispositivi malati mediante sostituti analoghi. Le patologie della valvola aortica (*stenosi valvolare aortica* e *insufficienza valvolare aortica*), costituiscono la forma più comune di questo tipo di malattie (Iung *et al.*, 2003), e in quasi tutti i casi è necessario sostituirla. A tal scopo, la chirurgia cardiaca ha sviluppato diverse protesi come sostituti di valvole aortiche danneggiate, incluse quelle meccaniche e biologiche (Vesely, 2005). Le valvole cardiache sono classificate in aortica, polmonare, mitrale e tricuspide. Nel trattamento chirurgico di patologie a carico delle valvole cardiache aortiche, l'approccio attualmente preferito è la loro sostituzione. Per quanto riguarda le valvole mitrale e tricuspide, nel soggetto adulto viene preferita la chirurgia conservativa della valvola nativa del paziente (valvuloplastica). Gli interventi chirurgici alle valvole tricuspide e polmonare sono rare nell'adulto, poiché vengono eseguiti in caso di significativo rigetto o di endocarditi. D'altra parte, sono stati riportati casi clinici in cui tutti i quattro tipi di valvole sono stati sostituiti con protesi, anche simultaneamente nello stesso paziente (Seeburger *et al.*, 2009).

a) Protesi meccaniche e biologiche

Attualmente esistono due gruppi di protesi disponibili, quelle *artificiali* o *meccaniche* e quelle *biologiche* o *bioprotesi*. La prima valvola cardiaca artificiale, denominata 'valvola a palla' (*caged-ball*), è stata impiantata nel 1952. È costituita da una gabbietta metallica contenente una pallina di caucciù siliconato. Successivamente, il dispositivo è stato migliorato mediante l'introduzione della 'valvola a disco oscillante' (*single-tilting disk*) nel 1969 e della 'valvola a due emidischi' (*bileaflet-tilting disk*) nel 1979, con lo scopo di ridurre i loro difetti (Filová *et al.*, 2009) (Figura 10).

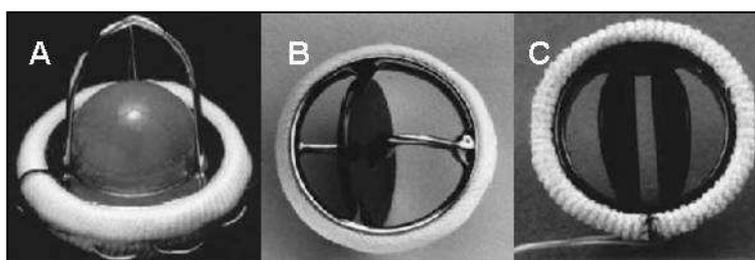


Figura 10. Protesi meccaniche (A: caged-ball; B: single-tilting disk; C: bileaflet-tilting disk).

Le protesi meccaniche sono formate principalmente da carbonio pirolitico combinato con componenti metallici e polimerici. Nonostante questi dispositivi abbiano una durata illimitata, il loro utilizzo comporta rischi quali l'insorgenza di endocarditi prevalentemente a livello della superficie del materiale estraneo, e la formazione di trombi che obbligano il paziente ad una terapia anticoagulante a vita con il rischio di complicazioni emorragiche.

Le protesi biologiche possono essere *eterologhe*, composte da tessuto porcino o bovino montate su di un supporto metallico e non, oppure *omologhe*, ossia valvole umane aortiche prelevate da cadavere (Figura 11).

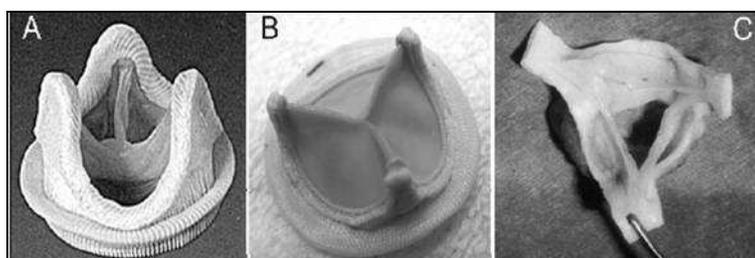


Figura 11. Protesi biologiche (A: porcina; B: bovina; C: omologa).

Le protesi biologiche vanno incontro a degenerazione nell'arco di 10-15 anni. Hanno il vantaggio di non richiedere la terapia anticoagulante, per cui sono selettivamente utilizzate in pazienti con diatesi emorragica o con età maggiore di 70 anni. Le protesi inducono una reazione immune da parte dell'organismo del paziente, trombosi e degenerazione (Hammermeister *et al.*, 2000). Sebbene la chirurgia sostitutiva valvolare con protesi meccaniche o biologiche ha dimostrato di modificare sostanzialmente il corso della malattia valvolare, sono stati studiati metodi alternativi a causa dei problemi legati all'impiego delle protesi.

b) Protesi biologiche ingegnerizzate sintetiche e naturali

Per risolvere i problemi legati all'utilizzo delle protesi meccaniche e biologiche, è nata l'ingegneria tessutale valvolare cardiaca (*tissue engineered heart valve*, TEHV), una scienza il cui scopo è ricreare la struttura e la funzionalità della valvola nativa (Neuenschwander e Hoerstrup, 2004). Gli studi in questo campo sono stati indirizzati verso la produzione di scaffolds in grado di mimare l'anatomia della valvola aortica nativa e la struttura della matrice extracellulare. Per raggiungere tale obiettivo, sono stati adottati due approcci: la produzione di materiali sintetici e la decellularizzazione di tessuti biologici (Neuenschwander e Hoerstrup, 2004). Tali scaffolds potrebbero essere riseminati *in vitro* o *in vivo*, svolgere la funzione di valvola aortica e con il tempo essere riassorbiti e/o rimodellati.

Per raggiungere tutto ciò, la valvola cardiaca ingegnerizzata deve:

- a) mantenere adeguate proprietà meccaniche ed emodinamiche per la vita del paziente;
- b) supportare l'adesione, il differenziamento e la proliferazione di cellule endoteliali/interstiziali valvolari;
- c) evitare la formazione di trombi, le reazioni immunitarie e la calcificazione;
- d) possedere una crescita e un rimodellamento appropriati alla crescita del paziente e alle domande fisiologiche.

Gli scaffolds sintetici sono stati preparati utilizzando polimeri, quali l'acido polilattico, poliglicolico e più recentemente materiali quali l'acido poliidrossialcanoato (Vesely, 2005). Le strutture tridimensionali ottenute sono risultate riassorbibili, non tossiche, con grandezza e capacità riparative e rigenerative simili a quelle dei lembi valvolari nativi (Knight *et al.*, 2008). La tecnica consente l'ottenimento di protesi riproducibili e a basso potenziale immunologico (Brody e Pandit, 2007).

In alternativa, la tecnica di decellularizzazione di un tessuto eterologo (valvole cardiache porcine e bovine) è stata impiegata per la preparazione di scaffolds acellulari di tipo biologico. Essa consiste nella rimozione di tutti gli elementi immunogenici quali cellule e acidi nucleici, senza alterare in maniera significativa le proprietà strutturali del tessuto (Brody e Pandit, 2007). Valvole di questo tipo sono state ampiamente testate in modelli animali e in alcuni casi in pazienti umani, sebbene con risultati finora non soddisfacenti (Simon *et al.*, 2003).

c) Matrici valvolari acellulari porcine

La decellularizzazione delle valvole cardiache porcine permette di ottenere uno scaffold acellulare in grado di agire da substrato per la ricellularizzazione e anche di possedere proprietà meccaniche ed emodinamiche che riflettono quelle delle normali valvole aortiche. Il processo di decellularizzazione dovrebbe rimuovere tutte le cellule dalla valvola di interesse, sia le *endoteliali* sia le *interstiziali* e i loro epitopi immunogenici, lasciando solo uno scaffold di tessuto connettivo al loro posto (Brody e Pandit, 2007). La presenza di antigeni sulla superficie cellulare nel tessuto xenogenico è la principale causa del rigetto di trapianto. Inoltre, la rimozione degli acidi nucleici, in particolare del DNA, è estremamente importante poiché un loro residuo potrebbe contribuire allo sviluppo di fenomeni di calcificazione (Ketchedjian *et al.*, 2005), causando così la degenerazione dell'impianto a lungo-termine. Lo scaffold dovrebbe essere in grado di svolgere effettivamente la funzione di valvola il prima possibile dopo l'impianto (Knight *et al.*, 2008), conservando le sue proprietà meccaniche ed emodinamiche originali. Gli scaffolds devono costituire un substrato adatto per la ricellularizzazione, cioè devono mantenere la struttura tridimensionale, la lamina basale e la fibronectina, che svolgono ruoli importanti nella crescita cellulare e nella migrazione (Grauss *et al.*, 2005). Inoltre non devono essere presenti residui di detergenti che potrebbero ridurre la viabilità delle cellule che potrebbero migrare all'interno della valvola (Ketchedjian *et al.*, 2005). Sono stati indagati numerosi metodi di decellularizzazione con lo scopo di ottenere un sufficiente livello di decellularizzazione e il mantenimento della normale struttura e funzione della matrice extracellulare. I detergenti comunemente impiegati sono i seguenti: a) sodio dodecil solfato (SDS); b) sodio colato (SC); c) Triton X-100; d) enzimi quali tripsina, endonucleasi. Diversi gruppi di ricerca hanno inoltre sviluppato specifici protocolli di decellularizzazione combinando due o più agenti, con lo scopo di rimuovere tutte le cellule rimaste con il minimo danno alla matrice. Sono state create quindi le seguenti associazioni: a) SDS e tripsina (Wilcox *et al.*, 2005); b) SD e Triton X-100 (Rieder *et al.*, 2004); c) SC e Triton X-100. Quest'ultimo protocollo, denominato metodo TRICOL, prevede l'utilizzo di Triton X-100, SC, soluzioni ipo- e iper-toniche e Benzonase. Questo metodo è stato sviluppato da Spina e collaboratori (Spina *et al.*, 2003; Iop *et al.*, 2009) per la decellularizzazione della valvola porcina aortica e polmonare rispettivamente.

SCOPO DELLA TESI

Nell'ultimo decennio, la presenza di cellule staminali multipotenti circolanti è stata oggetto di un grande interesse da parte della comunità scientifica. In termini di applicazione clinica, il sangue periferico (SP), rispetto al tessuto adiposo, alla cute e al midollo osseo, rappresenterebbe una fonte ideale perché è accessibile ed inesauribile durante il corso della vita, non richiede procedure estrattive invasive per il paziente, consente l'ottenimento di cellule per uso autologo e non richiede la crioconservazione del materiale di estrazione perché l'ottenimento del trapianto cellulare è possibile in coincidenza della necessità del paziente. Inoltre, non comportando alcun problema di tipo etico e non richiedendo costi di conservazione per il mantenimento di banche biologiche, il sangue periferico potrebbe rappresentare una valida alternativa al midollo osseo nel campo della medicina rigenerativa. In letteratura numerose pubblicazioni scientifiche riportano l'identificazione di cellule di tipo fibroblastoide le cui caratteristiche di crescita e di plasticità differenziativa sono risultate estremamente dissimili. Attualmente, l'esistenza e l'immunofenotipo della cellula staminale circolante, quale possibile candidato per la medicina rigenerativa, non è stato ancora ben definito e poche evidenze sono state riportate sulla loro capacità espansiva *in vitro*. Una più profonda comprensione delle popolazioni cellulari multipotenti circolanti nel sangue periferico e l'identificazione di un procedimento estrattivo standardizzato consentirebbe lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi al trapianto di midollo osseo.

Pertanto, in considerazione di questo, nel presente lavoro di tesi, in accordo con le linee guida definite dalla *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006), il sangue periferico è stato oggetto di studio quale fonte di cellule staminali multipotenti e le popolazioni cellulari aderenti alla plastica sono state caratterizzate per immunofenotipo, capacità espansiva *in vitro* e potenzialità multidifferenziativa. Lo studio è stato eseguito utilizzando il modello animale minipig. Lo schema sperimentale della ricerca ha previsto:

- a) l'isolamento di popolazioni cellulari da sangue periferico (CSP) mediante separazione su gradiente di Ficoll, semina su piastre di polistirene non condizionate e selezione per *adesione* in terreno di coltura costituito da MEM-alfa, siero bovino fetale e soluzione antibiotica;

- b) purificazione, espansione e caratterizzazione morfologica e fenotipica delle cellule CSP ;
- c) valutazione della cinetica di crescita *in vitro* e studio della stabilità fenotipica durante la coltura *in vitro* a lungo termine;
- d) analisi del potenziale differenziativo in senso adipogenico, osteogenico e cardiomiogenico mediante tecniche di immunocitochimica, immunofluorescenza, RT-PCR e Western Blotting;
- e) caratterizzazione della crescita delle cellule CSP su matrici acellulari valvolari porcine mediante analisi di microscopia elettronica a scansione, immunistochemica e immunofluorescenza.

MATERIALI E METODI

1. Isolamento di cellule multipotenti da sangue periferico

Le cellule staminali multipotenti da sangue periferico (CSP) sono state ottenute da campioni provenienti da maialini nani vietnamiti (*minipig*) ed estratte entro 24 ore dal prelievo. Il campione di sangue (10 ml), raccolto in tubi S-monovette (Sarstedt) contenenti litio eparina, è stato diluito con tampone fosfato (PBS) 1X nel rapporto 1:1 e poi stratificato (rapporto 2:1) su Ficoll-Hystopaque (Sigma-Aldrich). Dopo centrifugazione a 2000 rpm per 30 minuti, a temperatura ambiente, le popolazioni cellulari sono risultate separate come indicato in Figura 12 e l'anello linfocitario all'interfaccia tra la fase del plasma e quella del Ficoll, unitamente al plasma, è stato prelevato e raccolto in un tubo sterile (Becton-Dickinson). Dopo diluizione con PBS 1X nel rapporto 1:1, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 2800 rpm per 10 minuti.

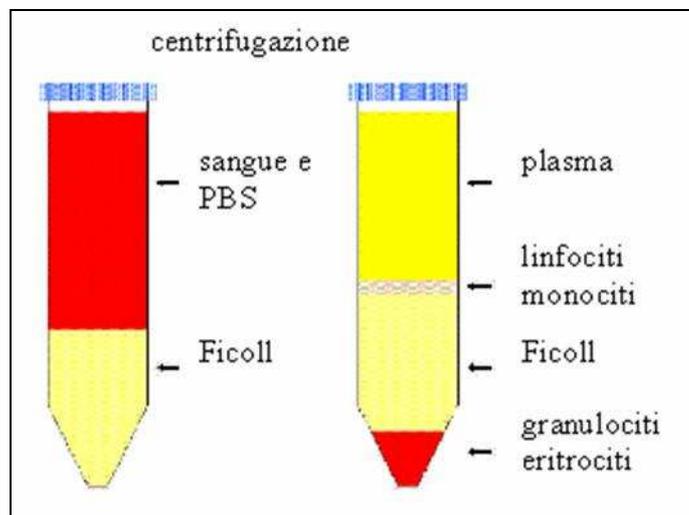


Figura 12. Formazione dei diversi strati di cellule dopo la centrifugazione con Ficoll.

Dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso in terreno di coltura preparato con alfa-modified eagle medium (α -MEM) *without nucleosides* (Invitrogen), siero bovino fetale (FBS) al 16.5% (Invitrogen), soluzione antibiotica di penicillina (100 μ g/ml) e streptomina (100 μ g/ml) (APS) all'1% (Sigma-Aldrich) e glutamax all'1% (Invitrogen) e poi seminato ad alta densità in piastre di coltura non condizionate

(Becton-Dickinson). Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C, in atmosfera umidificata al 95% contenente CO₂ al 5%. Alla comparsa di elementi cellulari a morfologia fibroblastoide dopo 7-10 giorni dalla semina, sono stati eseguiti 2-3 lavaggi della piastra con PBS 1X ed il terreno è stato poi cambiato ogni 3 giorni fino al raggiungimento della confluenza cellulare dell'80%. Le colture primarie sono state distaccate mediante trattamento con una soluzione di EDTA allo 0.02% (Sigma-Aldrich) e tripsina allo 0.25% (Sigma-Aldrich) in PBS 1X. Le subcolture cellulari sono state preparate utilizzando una densità di semina di 5000 cellule/cm².

2. Analisi di microscopia ottica

Le colture cellulari sono state osservate giornalmente mediante microscopio ottico DM/IL e le immagini sono state acquisite mediante videocamera Nikon Digital Sight DS-SMc (Nikon Corporation).

3. Studio della morfologia cellulare mediante microscopia elettronica

I campioni sono stati lavati in PBS 1X, fissati mediante soluzione di tampone cacodilato 0.1 M pH 7.2 con glutaraldeide al 3% e conservati a 4°C fino al momento della disidratazione. Quest'ultima è stata eseguita per immersione in scala ascendente di alcoli (70%, 90%, 95%) per 5 minuti per ciascun alcool. I campioni, mantenuti in alcool assoluto fino al momento dell'analisi, sono stati poi sottoposti a Critical Point Drying e metallizzati con oro. Le immagini sono state acquisite mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione presso il Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova CUGAS.

4. Studio dell'immunofenotipo

L'identificazione di specifici marcatori di membrana sulle popolazioni cellulari aderenti CSP è stata eseguita mediante citometria a flusso (CFM).

4.1 Basi teoriche della CFM

La nascita della citofluorimetria a flusso (CFM) avviene intorno agli anni '70, determinando un veloce ed intenso sviluppo delle tecniche istologiche e citochimiche. Inizialmente era limitata alla misura di 1-2 parametri: uno per le misure fisiche e l'altro per la fluorescenza. La CFM portò grande impulso allo studio del sistema immunitario,

grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali marcati con *isotiocianato di fluoresceina* (FITC). La grande complessità del sistema immunitario e la presenza di diverse subpopolazioni che reagivano con lo stesso anticorpo permisero di sviluppare a) anticorpi monoclonali sempre più specifici; b) la ricerca di nuovi coloranti fluorescenti da coniugare agli anticorpi; c) la creazione di citofluorimetri a flusso multiparametrici. Inizialmente, i primi problemi che gli studiosi dovettero affrontare furono trovare coloranti che potessero essere coniugati agli anticorpi senza modificare la loro capacità di legame all'antigene, e selezionare fluorocromi con spettri distinti di emissione. Un punto di svolta nella CFM fu lo sviluppo di coloranti come le ficobiliproteine, fluorocromi naturali solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro, facilmente coniugabili con anticorpi monoclonali, con elevate rese quantiche (Figura 13).

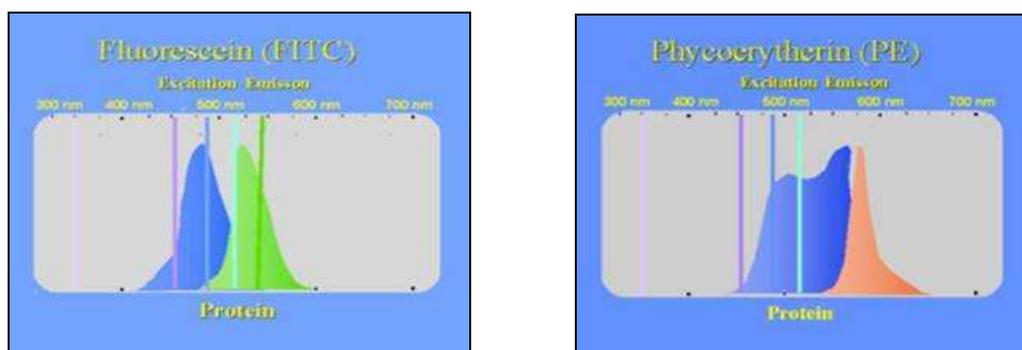


Figura 13. Spettro di eccitazione-emissione dei fluorocromi FITC e PE.

L'analisi citofluorimetrica permette di misurare caratteristiche chimiche e fisiche delle cellule o, per estensione, di altre particelle biologiche. Rende possibile la misurazione di proprietà multiple di singole cellule ad una velocità molto rapida, permettendo una dettagliata analisi qualitativa e quantitativa di sospensioni cellulari monodisperse e si basa sulla misurazione, mediante l'utilizzo di anticorpi coniugati con fluorocromi, di alcune caratteristiche della cellula quali la dimensione, la granularità superficiale, il contenuto di DNA, di RNA, l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche o la fosforilazione di proteine.

4.2 Principio di funzionamento della CFM

Il campione da analizzare, costituito da una sospensione cellulare, viene convogliato da un sistema fluidico di trasporto o *sheath fluid*, generalmente PBS o altro tampone, fino al punto in cui avviene la misurazione, cioè nella *camera di flusso*. Il diametro del flusso è determinato dal *nozzle tip*, un piccolo orifizio cilindro-conico in ceramica scelto in base alle dimensioni delle particelle da separare (70-100 μM di diametro). Nella camera di flusso il campione incontra un fascio di luce laser focalizzata di alcune decine di micron (Figura 14).

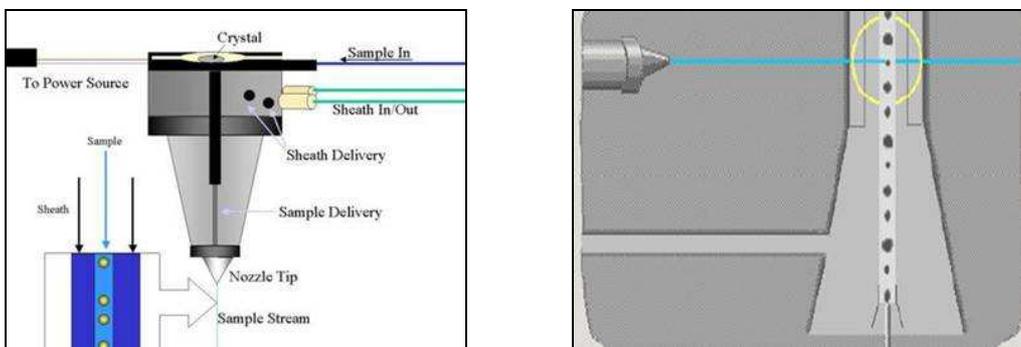


Figura 14. Camera di flusso e punto in cui il laser intercetta le cellule.

Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (*stream*), il suo incontro con ogni singola cellula genera dei segnali legati alle caratteristiche fisiche della particella (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di membrana), e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali vengono raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, ed inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, digitalizzati e associati tra loro, sono inviati ad un computer che provvede alla presentazione dei medesimi e alla loro definizione statistica (Figura 15).

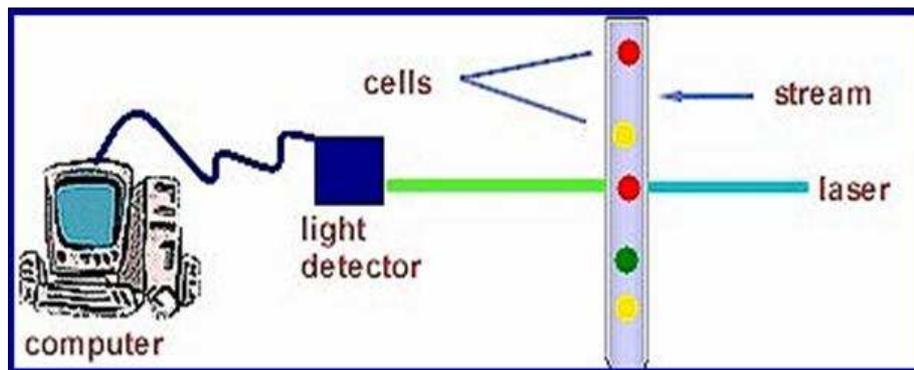


Figura 15. Schema del citofluorimetro.

4.3 Caratterizzazione fenotipica delle popolazioni CSP

a) Analisi di citometria

Per ottenere un numero sufficiente di cellule adatto per l'analisi citometrica, le popolazioni cellulari sono state espanse per sette generazioni. Le subcolture VIII di 3 popolazioni cellulari differenti sono state distaccate dalla piastra mediante trattamento con EDTA/tripsina, centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e risospese in PBS allo 0.2% di albumina sierica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) (PBS-BSA). Ogni campione è stato allestito trattando, a temperatura ambiente per 15 minuti, 2×10^5 cellule/100 μ l PBS-BSA con 5 μ l di anticorpo primario anti-CD44 non coniugato (AbD Serotec), -SLA-DR non coniugato (AbD Serotec), -CD106 coniugato FITC (Acris), -CD90 coniugato FITC (Lifespan Bioscience), -CD34 coniugato PE (Santa Cruz), -CD45 coniugato PE (Santa Cruz), -CXCR4 coniugato PE (Santa Cruz). L'incubazione dei campioni con gli anticorpi primari coniugati a fluorocromo è stata eseguita al buio.

In parallelo, per i marcatori CD44 e SLA-DR è stato preparato un campione negativo mediante marcatura con 5 μ l dei rispettivi anticorpi secondari, entrambi coniugati con FITC (AbD Serotec).

Per quanto riguarda gli altri marcatori, il campione negativo è stato allestito mediante incubazione con 5 μ l del controllo isotipico corrispondente coniugato con lo stesso fluorocromo legato all'anticorpo primario. Il controllo isotipico per il CD106 e per il CD90 è stato acquistato dalla ditta AbD Serotec, mentre gli altri controlli isotipici sono stati acquistati dalla ditta Santa Cruz. Terminata l'incubazione di 15 minuti, tutti i campioni sono stati risciacquati con PBS-BSA e centrifugati a 1200 rpm per 5 minuti. Dopo allontanamento del surnatante, le cellule relative ai campioni trattati con gli anticorpi anti-CD106, -CD90, -CD34, -CD45, -CXCR4 sono state mantenute in

ghiaccio fino al momento dell'analisi mentre quelle dei campioni trattati con l'anticorpo anti-CD44 e -SLA-DR sono state incubate per 15 minuti, al buio, con 5 μ l del corrispondente anticorpo secondario coniugato FITC. Dopo aggiunta di PBS-BSA, tutti i campioni sono stati caricati sul citofluorimetro *MOFLO High Speed Cell Sorter* (Beckman Coulter) per l'analisi. I dati relativi a 10^4 cellule totali sono stati acquisiti mediante il programma *Summit 4.3* nel range di lunghezza d'onda di 530 ± 40 (FITC) e 580 ± 30 nm (PE). I dati sono stati espressi come percentuale di cellule positive rispetto al campione negativo e sono stati ottenuti applicando la formula statistica *Substraction* del programma di analisi *Summit 4.3*.

b) Immunocitochimica

Le subcolture VIII sono state utilizzate per lo studio di espressione di alfa-actina. I campioni sono stati seminati (5×10^3 cellule/cm²) su piastre Chamber slides (Becton-Dickinson) e mantenute in coltura per 24 ore in terreno di espansione. Dopo fissaggio in formalina al 10% preparata in PBS 1X, i campioni sono stati sottoposti al trattamento di 1 ora con una soluzione di H₂O₂ (Sigma-Aldrich) al 15%. Sono seguiti lavaggi di 5 minuti in PBS e la disattivazione dei siti aspecifici mediante incubazione per 45 minuti a temperatura ambiente con PBS contenente HS al 10%. Dopo lavaggi in PBS, i campioni sono stati incubati in cameretta umida con una soluzione di anticorpo primario monoclonale mouse anti- α -actina (Abcam), diluito 1:100 in PBS contenente HS al 3%. Dopo tre lavaggi di 10 minuti in PBS con HS al 10%, è stata eseguita l'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, in cameretta umida con l'anticorpo secondario *Biotynilated Pan-specific secondary antibody* (Vectashield) (4 gocce/5 ml di PBS contenente HS all'1.5%). Successivamente, i campioni sono stati trattati con una soluzione A/B (ABC kit, Vectashield) per 30 minuti a temperatura ambiente. La rivelazione dei siti specifici di legame è stata eseguita mediante l'utilizzo di una soluzione preparata con 5 ml di acqua distillata, 100 μ l di PBS 1X, 200 μ l di 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), 100 μ l di H₂O₂. La reazione è stata bloccata dopo 1 minuto utilizzando acqua distillata. Dopo lavaggio in PBS, i campioni sono stati contrastati con ematossilina e poi montati con il montante Dako *ultramount aqueous permanent medium*.

5. Valutazione della stabilità fenotipica delle popolazioni CSP

E' noto che, in adeguate e stabili condizioni di coltura *ex vivo*, le cellule staminali multipotenti mantengono lo stato indifferenziato. Per valutare la stabilità fenotipica delle popolazioni CSP estratte, l'analisi citometrica di espressione dei marcatori di superficie CD106, CD90, CD34, CD45, CXCR4, CD44 e SLA-DR è stata ripetuta su generazioni diverse nel corso della coltura espansiva fino alla subcoltura XXXIX. I campioni sono stati allestiti come riportato nel paragrafo precedente. I dati ottenuti sono stati messi a confronto con quelli relativi alla subcoltura VIII.

6. Identificazione del *Doubling population*

La valutazione della capacità espansiva delle cellule CSP ha previsto lo studio del *doubling population cumulativo* (Population doubling level) (d.p.c). La durata vitale *in vitro* di una popolazione cellulare *non trasformata* è definita dal numero di raddoppiamenti eseguiti a partire dall'isolamento. Il d.p.c è dunque una misura intrinseca dell'età di una particolare popolazione cellulare. Il tempo di doubling population è caratteristico per ogni tipo cellulare e si mantiene stabile durante la crescita espansiva delle cellule staminali fino al sopraggiungere del loro invecchiamento. Nei nostri esperimenti la crescita delle popolazioni CSP è stata eseguita mediante l'identificazione del doubling population cumulativo sulle generazioni comprese tra la VIII e la XXXIX ed ha previsto la semina delle popolazioni alla densità di 5×10^3 cellule/cm², in piastre *multiwell* non condizionate da 6 pozzetti (Becton-Dickinson). Per ogni campione sono state preparate tre repliche. Ad intervalli di 24 ore dalla semina per ogni passaggio, il numero di cellule adese è stato misurato previo distacco con la soluzione di EDTA/tripsina e conta con la camera di Burker.

Ad ogni passaggio sono stati calcolati a) il valore medio del numero di cellule raccolte in 3 pozzetti, b) la deviazione standard, c) il doubling population (d.p.), d) il doubling population cumulativo.

Il doubling population è stato calcolato applicando la seguente formula:

$$\text{d.p.} = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

dove N rappresenta il numero medio delle cellule raccolte, mentre N₀ rappresenta il numero delle cellule seminate in ciascun pozzetto.

Il doubling population cumulativo in corrispondenza di un determinato passaggio, è stato calcolato sommando il doubling population di quel passaggio con quelli relativi alle precedenti generazioni.

7. Studio della potenzialità multidifferenziativa delle popolazioni CSP

Per definire il grado di potenzialità differenziativa delle cellule CSP, è stata valutata la risposta cellulare al trattamento con terreni specifici induttivi di tipo *adipogenico*, *osteogenico* e *cardiomiogenico*. Le cellule CSP sono state seminate alla densità di 3×10^3 cellule/cm² in piastre non condizionate contenenti un vetrino sterile idoneo alla crescita cellulare (Becton-Dickinson) e terreno proliferativo. Al raggiungimento dell'80% di confluenza, il medium di coltura è stato sostituito con il terreno induttivo. Le colture sono state osservate giornalmente tramite microscopia ottica e il cambio di terreno è stato eseguito nella misura pari al 50% due volte alla settimana. Per definire la stabilità differenziativa delle cellule CSP durante la coltura espansiva, lo studio è stato eseguito su subcolture di VIII, XXIV, XXXIX generazione e i risultati sono stati messi a confronto.

7.1 Differenziamento adipogenico

Le cellule sono state trattate con il terreno specifico induttivo costituito da Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) (Euroclone), FBS al 10% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich), insulina (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich), isobutilmetilxantina (IBMX) (0.5 mM) (Sigma-Aldrich), desametasone (1 µM) (Sigma-Aldrich), indometacina (60 µM) (Sigma-Aldrich). In parallelo, è stato preparato il campione di controllo mantenuto in coltura nel terreno proliferativo. A definiti intervalli di tempo dall'induzione del differenziamento (7 e 14 giorni), le cellule sono state lavate con PBS 1X e fissate in soluzione di formalina al 10% in PBS, per 1 ora a temperatura ambiente, per lo studio mediante la colorazione citochimica Oil Red O degli accumuli di trigliceridi a livello citoplasmatico.

7.1.1 Colorazione Oil Red O

E' stata preparata una soluzione di Oil Red O (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 5 mg/ml in isopropanolo (Sigma-Aldrich). Dopo filtrazione, la soluzione è stata diluita 3:2 in acqua distillata, incubata per 1 ora a temperatura ambiente ed infine filtrata prima dell'uso.

Dopo lavaggio in acqua di fonte, le cellule fissate in formalina sono state incubate per 15 minuti con la soluzione filtrata Oil Red O, lavate in acqua di fonte e contrastate con ematossilina per 1-2 minuti. Dopo 2 lavaggi veloci in acqua distillata e 1 in acqua di fonte per 6 minuti, i preparati sono stati disidratati con la scala ascendente degli alcoli e poi montati con il montante *crystal mount aqueous mounting medium* (Sigma-Aldrich). I campioni sono stati poi osservati al microscopio ottico DM/R (Leica) e le immagini sono state acquisite con la videocamera DC 500 (Leica).

7.2 Differenziamento osteogenico

Le cellule sono state trattate con il terreno specifico induttivo costituito da alfa-modified eagle medium (α -MEM) *without nucleosides* (Invitrogen), FBS al 10% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich), desametasone (100 nM) (Sigma-Aldrich), β -glicerofosfato (10 mM) (Sigma-Aldrich), acido ascorbico (0.05 mM) (Sigma-Aldrich). In parallelo, è stato preparato il campione di controllo mantenuto in coltura nel terreno proliferativo.

Dopo 7 e 14 giorni, le cellule sono state fissate in formalina al 10% in PBS per una notte a 4°C, reidratate con acqua MilliQ, e successivamente sottoposte alla colorazione di Von Kossa per l'identificazione di sali di calcio nella matrice extracellulare.

7.2.1 Colorazione Von Kossa

Le cellule fissate in formalina sono state reidratate in acqua MilliQ, trattate con una soluzione acquosa di nitrato d'argento all'1% (Sigma-Aldrich) e poi esposte a luce UV per 45 minuti. Dopo lavaggio con acqua MilliQ, i campioni sono stati trattati con una soluzione acquosa contenente tiosolfato di sodio (Sigma-Aldrich) al 3% per 5 minuti, lavate con acqua MilliQ e colorate con una soluzione acquosa filtrata di safranina (Sigma-Aldrich) allo 0.2%. Dopo disidratazione veloce mediante alcool al 95% e alcool assoluto, i preparati sono stati montati con il montante Eukitt (Fluka). I preparati così ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico DM/R (Leica) e le immagini sono state acquisite mediante la videocamera DC 500 (Leica).

7.3 Differenziamento cardiomiogenico

Per indagare la potenzialità differenziativa in senso cardiomiogenico, le cellule CSP sono state seminate alla densità di 3×10^3 cellule/cm² in terreno proliferativo o a) in piastre non condizionate *multiwell* da 24 pozzetti contenenti vetrini idonei alla crescita cellulare per lo studio morfologico tramite microscopia elettronica a scansione (SEM) e per lo studio di specifici marcatori di linea mediante immunofluorescenza, o b) in piastre di diametro 100 mm (P100, Becton-Dickinson) per studi di espressione mediante RT-PCR e Western Blotting. Al raggiungimento della confluenza di circa l'80%, è stato indotto il differenziamento mediante trattamento con il terreno cardiomiogenico, costituito da DMEM LG (Invitrogen), FBS al 20% (Sigma-Aldrich), APS all'1% (Sigma-Aldrich), glutamax all'1% (Invitrogen) e 5-azacitidina (5-AZA) (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 6 μ M. Le cellule di controllo sono state coltivate nel medesimo terreno privo solo dell'agente demetilante 5-AZA. Dopo 24 ore, il terreno è stato sostituito con medium costituito da DMEM LG (Invitrogen), APS all'1% (Sigma-Aldrich), glutamax all'1% (Invitrogen) addizionato con FBS (Sigma-Aldrich) al 20% per i campioni trattati, al 5% per le cellule di controllo. Il cambio di terreno è stato eseguito nella misura pari al 50% due volte alla settimana. Ad intervalli di tempo di 7 e 14 giorni, i campioni sono stati fissati ed analizzati come sopra indicato.

7.3.1 Immunofluorescenza e microscopia confocale

Dopo 7 e 14 giorni di trattamento, le cellule sono state lavate in PBS 1X e fissate in para-formaldeide al 4% in PBS 1X per 10 minuti e a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio in PBS 1X, è stata eseguita la saturazione dei siti aspecifici incubando le cellule con una soluzione al 10% di *Horse Serum* (HS) (Sigma-Aldrich) in PBS 1X per 1 ora e a temperatura ambiente.

Successivamente, è stata eseguita l'incubazione di 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti in una soluzione di PBS 1X con HS al 3%. Sono stati utilizzati gli anticorpi mouse anti-actina muscolo specifica (Acris) diluito 1:100, mouse anti-fosfolambano (Acris) diluito 1:50, mouse anti-troponina cardiaca T (Acris) diluito 1:100. Dopo 3 lavaggi di 10 minuti in PBS 1X con HS all'1.5%, è stato aggiunto l'anticorpo secondario *Biotynilated Pan-specific secondary antibody* (Vectashield) (4 gocce/5 ml di PBS contenente HS all'1.5%). Le cellule sono state quindi incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi di 3 minuti in PBS 1X, le cellule sono state trattate per 10 minuti a temperatura ambiente al buio con fluorocromo

Fluorescein Avidin DCS del Fluorescent Avidin Kit (Vectashield) diluito 1:500 in soluzione di HEPES 10 mM, NaCl 0.15 M a pH 8.2. Dopo 3 lavaggi di 3 minuti in PBS 1X, i preparati così ottenuti sono stati montati con il montante *aqueous mounting medium with DAPI* (4',6-diamidino-2-fenilindolo) (Vectashield). In parallelo, il controllo negativo è stato allestito utilizzando la medesima procedura omettendo l'aggiunta dell'anticorpo primario. I preparati sono stati osservati mediante il microscopio confocale Leica TCS-SP5 (Leica), dotato di programma gestionale LAS AF (Leica).

7.3.2 RT-PCR: reazione di retrotrascrizione e polimerizzazione a catena

a) Estrazione di mRNA

Per eseguire la procedura di estrazione di mRNA è stato utilizzato il Trizol (Invitrogen), soluzione monobasica di fenolo e guanidina isotiocianato. Prima dell'induzione (controllo) e dopo 7 e 14 giorni di trattamento, le cellule sono state risciacquate e distaccate meccanicamente in PBS 1X freddo mediante l'uso di uno scraper, raccolte in tubi da 1.5 ml e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato incubato con la soluzione di Trizol nella misura di 1 ml per $5-10 \times 10^6$ cellule, per 5 minuti, a temperatura ambiente. In seguito all'aggiunta di soluzione di cloroformio (Sigma-Aldrich) (0.2 ml per 1 ml di Trizol), i campioni sono stati agitati manualmente per 15 secondi ed incubati per 3 minuti a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione a 12000 g per 15 minuti a 4°C, la fase superiore acquosa è stata prelevata e trasferita in un tubo da 1.5 ml. Successivamente è stata eseguita la precipitazione dell'RNA dalla fase acquosa mediante aggiunta di una soluzione di isopropanolo (Fluka) (0.5 ml per 1 ml di Trizol impiegato) ed incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4°C e i pellet sono stati lavati in etanolo al 75% (1 ml per 1 ml di Trizol impiegato), sottoposti ad agitazione e poi centrifugati a 7500 g per 5 minuti a 4°C. Dopo rimozione del surnatante, il pellet è stato lasciato asciugare all'aria per 10 minuti e successivamente risospeso in una soluzione acquosa contenente l'inibitore delle RNase cellulari, DEPC (diethylpyrocarbonate), allo 0.1% (Invitrogen). L'RNA risospeso è stato trasferito in tubi da 0.2 ml RNase-free e incubato per 10 minuti a 60°C. Dopo quantificazione spettrofotometrica, è stato infine trasferito a - 80°C.

b) Quantificazione spettrofotometrica di RNA mediante NANODROP

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata mediante lo spettrofotometro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) (Figura 16).



Figura 16. Spettrofotometro NANODROP 2000.

Utilizzando 1 μ l di campione, lo strumento è in grado di determinare automaticamente la lettura del campione a 260, 280 e 230 nm di lunghezza d'onda, la concentrazione ed i relativi rapporti per determinare il grado di purezza del campione analizzato.

c) Reazione di retrotrascrizione

Per la reazione di trascrizione dell'RNA in cDNA, è stata preparata la miscela di reazione utilizzando 1 μ l di primer oligo(dT)₂₃ (Sigma-Aldrich), 1 μ l di dNTP (Sigma-Aldrich) e 1 μ g di RNA. È stata poi aggiunta acqua sterile fino ad un volume finale di reazione di 10 μ l. Dopo riscaldamento della soluzione per 10 minuti a 70°C, sono stati aggiunti i seguenti componenti: 2 μ l di buffer con DTT (Sigma-Aldrich), 1 μ l di trascrittasi inversa del virus Moloney della leucemia murina (M-MLV) (Sigma-Aldrich), 0.5 μ l di inibitore di RNase (Sigma-Aldrich) e 6.5 μ l di acqua sterile, per un volume finale di reazione di 20 μ l. La soluzione è stata incubata per 10 minuti a temperatura ambiente, riscaldata per 50 minuti a 37°C e poi incubata per 10 minuti a 94°C.

d) PCR: reazione polimerasica a catena

Un'aliquota di cDNA (3 μ l) è stata amplificata mediante reazione PCR utilizzando 25 μ l di mix dell'enzima Taq polimerasi contenente la miscela di dNTP (Sigma-Aldrich) e 1

µl di ciascuno dei due primer, forward e reverse, sintetizzati dalla ditta Invitrogen. Sono stati aggiunti 20 µl di acqua sterile per raggiungere un volume finale di 50 µl. Le coppie di primer, utilizzate per lo studio di espressione genica per i marcatori di differenziamento cardiomiogenico, sono indicate in Tabella 1.

| Nome | Sequenza 5'→3' |
|---------------------------|---------------------------------|
| MLC, MLC5f F | GCA GCC CAG CAG TTT CAT CAT |
| MLC, MLC5f R | CCA TCA GGG CTT CCA CTT CTT C |
| alfa-actina scheletrica F | AGG GGA AGG GGG CAG GGA GTG AGA |
| alfa-actina scheletrica R | AGA GAA CGC GCT TGG GGG CTT GTG |
| MHC cardiaca F | CCT CAA GGG CGG CAA GAA |
| MHC cardiaca R | CCT CAG GAT GGG GCA GAT |
| Desmina F | CCA GCG GCT ACC AGG ACA ACA T |
| Desmina R | CCA AGG GCC AGG CTC ACT CAC T |
| GAPDH F | ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC |
| GAPDH R | TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA |

Tabella 1. Coppie di primer forward e reverse utilizzati per l'analisi di espressione mediante RT-PCR di MLC, alfa-actina scheletrica, MHC cardiaca, desmina, GAPDH. MLC: myosin light chain; MHC: myosin heavy chain (Liu *et al.*, 2004).

La reazione è stata eseguita utilizzando il termociclatore PTC-100 (MJ Research Inc.) programmato nel seguente modo:

- 1) 94°C per 5 minuti (predenaturazione del DNA)
- 2) 33 cicli (desmina), 35 cicli (GAPDH, MHC cardiaca), 38 cicli (MLC e alfa-actina) della seguente reazione:
 - 94°C per 1 minuto (denaturazione del DNA e separazione dei filamenti)
 - 57.5°C (GAPDH), 55.4°C (MHC cardiaca), 65°C (MLC e alfa-actina) e 72°C (desmina) per 1 minuto (appaiamento dei primer con le sequenze complementari sul DNA stampo)
 - 72°C per 1 minuto (polimerizzazione del DNA)
- 3) 72°C per 10 minuti, per completare la fase di polimerizzazione.

e) Elettroforesi su gel di agarosio

L'analisi elettroforetica dei prodotti di reazione PCR è stata eseguita su gel di agarosio (Sigma-Aldrich) preparato al 2% in soluzione tampone TBE 1X (0.04 mM tris-Borato,

0.001 M EDTA, pH 8) (Sigma-Aldrich) ed utilizzando Gel Red (0.1 µl/ml) (Biotium). Per il caricamento su gel, sono stati utilizzati 8 µl di DNA di ciascun campione addizionati di 2 µl di soluzione colorante Gel Loading Buffer (Sigma-Aldrich). Come marcatore di riferimento per i pesi molecolari tra 50 e 2000 pb è stato utilizzato il prodotto PCR Marker (Sigma-Aldrich). Le bande dei campioni amplificati sono state visualizzate mediante esposizione ai raggi UV attraverso lo strumento Gel Doc 2000 (BioRad).

7.3.3 Western Blotting

Mediante Western Blotting è stata indagata la presenza della proteina fosfolambano, per confermare i dati ottenuti mediante analisi di immunofluorescenza.

a) Estrazione delle proteine

Prima dell'induzione (controllo) e dopo 7 e 14 giorni di trattamento, le cellule sono state risciacquate e distaccate meccanicamente in PBS 1X freddo mediante l'uso di uno scraper, raccolte in tubi da 1.5 ml e centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti a 4°C. Dopo rimozione del surnatante, i precipitati sono stati trattati con 120 µl di buffer di lisi (Triton X-100 all'1% v/v, sodio desossicolato allo 0.5% p/v, NaCl 0.15 M, Tris HCl 10 mM pH 7.6, cocktail di inibitori di proteasi all'1% -Sigma-Aldrich), omogeneizzati mediante pipettamento con una siringa da insulina dotata di un ago da 29G ed infine centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante è stato quindi raccolto e quantificato.

b) Quantificazione degli estratti cellulari

La quantificazione proteica è stata eseguita utilizzando il BCA Protein Assay Kit (Pierce) che sfrutta il metodo colorimetrico dell'acido bicinconinico (BCA). Le soluzioni A, formata dai componenti carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, acido bicinconinico e tartrato di sodio in una soluzione 0.1 M di NaOH, e B (soluzione al 4% di solfato di rame) sono state miscelate in proporzione 50:1 rispettivamente, per un volume finale di 1 ml. Per la costruzione di una curva di taratura, sono stati preparati 9 campioni standard a concentrazione nota di BSA, da 0 µg/ml a 2000 µg/ml. Standard e campioni sono stati aggiunti in volume di 20 µl alla miscela di reattivi A + B e dopo agitazione per 30 secondi sono stati incubati per 30 minuti a 37°C. La lettura

spettrofotometrica è stata eseguita mediante il lettore ELISA Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments) alla lunghezza d'onda di 570 nm.

c) Analisi mediante Sodio Dodecil Solfato Poliacrilammide Gel Elettroforesi (SDS-PAGE)

Per ciascun campione sono stati caricati su gel 40 µg. Dopo riduzione in una soluzione contenente Tris HCl 50 mM pH 6.8, SDS al 2%, glicerolo al 10%, β-mercaptoetanololo al 5%, blu di bromofenolo allo 0.03% e successiva ebollizione a 100°C per 5 minuti, un volume totale di 50 µl di miscela è stato caricato su un gel di poliacrilammide discontinuo costituito da 10 ml di gel Stacking (4% soluzione acrilammide/bis-acrilammide 37:1, Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS al 10%, 100 µl ammonio persolfato (APS), 16 µl TEMED (Sigma-Aldrich)) e 20 ml di gel Running (12% soluzione acrilammide/bis-acrilammide 37:1, Tris HCl 375 mM pH 8.8, SDS al 10%, 70 µl APS, 15 µl TEMED), colato e montato su cella per elettroforesi VP-140 (Elettrofor). I campioni sono stati sottoposti ad una corrente costante di 50 mA per 2 ore in tampone di corsa costituito da Tris HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM e SDS allo 0.03%. Dopo la separazione mediante corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (GE Amersham) con porosità 0.45 m preidratata in acqua MilliQ ed equilibrata per 15 minuti in tampone di trasferimento contenente Tris HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS allo 0.03%, metanolo al 20%. Successivamente è stato assemblato l'apparato di trasferimento ed un campo elettrico costante ortogonale al gel di 400 mA è stato generato per un tempo di 1 ora e 30 minuti.

d) Immunoblotting

Il blocco dei siti aspecifici è stato eseguito mediante incubazione della membrana per 1 ora con una soluzione al 5% di latte scremato in TBS-T (Tris HCl pH 7.6, NaCl, 0.1% Tween 20) a temperatura ambiente, in agitazione. Dopo due lavaggi rapidi in abbondante TBS-T, la membrana è stata incubata con una soluzione di anticorpo primario anti-fosfolambano (Acris) diluito 1:2000 in una soluzione all'1% di latte scremato in TBS-T a temperatura ambiente per una notte a 4°C. Dopo aver eseguito diversi lavaggi in TBS-T (due rapidi in TBS-T abbondante, poi uno di 15 minuti e tre di 5 minuti), la membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti goat-HRP (GE Amersham) diluito 1:25000.

Successivamente la membrana è stata lavata più volte in TBS-T (due lavaggi rapidi in TBS-T abbondante, poi uno di 15 minuti e tre di 5 minuti).

e) Rivelazione

La rivelazione è stata eseguita secondo il protocollo suggerito dalla ditta fornitrice del kit ECL (GE Amersham) ed ha previsto l'incubazione per 1 minuto della membrana con 0.125 ml/cm² di soluzione di rivelazione, costituita dalle soluzioni A e B in proporzione 1:1. Una volta asciugata, la membrana è stata posta in cella di esposizione, al buio, e a contatto con una lastra autoradiografica (GE Amersham) per un tempo variabile da 1 a 15 minuti. Successivamente la lastra impressionata è stata sviluppata tramite incubazione in liquido di sviluppo X-OMAT EX II e di fissaggio RP X-OMAT LO (Kodak).

8. Valutazione della crescita delle popolazioni CSP su matrici valvolari acellulari

8.1 Decellularizzazione dei lembi aortici e polmonari mediante il metodo TRICOL

I lembi valvolari aortici (VDA) e polmonari (VDP) sono stati preparati dal gruppo di ricerca del Prof. Spina, presso il Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali - Università di Padova. Il protocollo utilizzato per la decellularizzazione ha previsto l'utilizzo del metodo TRICOL (Spina *et al.*, 2003; Iop *et al.*, 2009).

Le matrici valvolari aortiche e polmonari sono state ottenute da animali minipig di 9-12 mesi d'età. I cuori sono stati prelevati presso il Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie dell'Università degli Studi di Padova (Agripolis-Legnaro) in appositi locali immediatamente dopo il sacrificio animale, trasferiti in contenitori sterili contenenti soluzione fisiologica. Successivamente, è stata eseguita la dissezione delle radici aortiche e polmonari in condizioni asettiche in una cappa a flusso laminare. I campioni sono stati posti in soluzione fisiologica fresca all'interno di tubi, e lasciati equilibrare in agitazione per 4 ore a 4°C. Dopo rimozione del tampone, è stata eseguita la prima fase di inibizione delle proteasi mediante aggiunta della soluzione costituita dal 10% della soluzione tampone madre "A" (formata da ascorbato di sodio o acido ascorbico ed EDTA sciolti in PBS, pH 7.4, "T.m.A."), dimetilsolfossido (DMSO) al 10% ed inibitori di proteasi, in acqua MilliQ. Sono state utilizzate le due seguenti soluzioni di inibitori di proteasi: a) fenilmetilsulfonil fluoruro (P.M.S.F.) e N-etilmaleimide (N.E.M.) in un tubo; b) benzamidina (B.A.) e iodoacetammide (I.A.) nell'altro tubo. I tubi sono stati

posti in agitazione a 4°C. Dopo 8 ore, gli inibitori e il DMSO sono stati eliminati mediante lavaggio con soluzione ipotonica di T.m.a. al 10% in acqua MilliQ, e i tubi sono stati posti in agitazione a 4°C per altre 8 ore. Successivamente, è stata eseguita una seconda fase di inibizione delle proteasi mediante soluzione di T.m.a. al 10%, Triton X-100 all'1% ed inibitori, in acqua MilliQ, ponendo i tubi in agitazione a 4°C. Dopo 8 ore, i campioni sono stati lavati con T.m.a. al 10% e Triton X-100 allo 0.1%, in acqua MilliQ, in agitazione a 4°C per 8 ore. Sono stati poi eseguiti due lavaggi (ciascuno di 8 ore, in agitazione a 4°C) con soluzione ipertonica di T.m.a. al 10%, NaCl 0.5 M, Triton X-100 allo 0.1%, in PBS isotonic. Per la successiva eliminazione dei sali, i campioni sono stati lavati due volte con una soluzione di T.m.a. al 10% e Triton X-100 allo 0.1%. La soluzione del primo lavaggio è stata preparata in acqua MilliQ, mentre quella del secondo è stata preparata in PBS. I tubi sono stati posti in agitazione per 1 ora e 30 minuti, a 4°C durante il primo lavaggio mentre a temperatura ambiente per il secondo, poiché il colato a 4°C tende a solidificare. I campioni sono stati poi trattati con soluzione di T.m.a. al 10% e colato di sodio 10 mM o acido colico 10 mM, in PBS. I tubi sono stati mantenuti per 8 ore in agitazione a temperatura ambiente ed il trattamento è stato eseguito due volte. Per eliminare i detergenti ed i residui di matrice, i campioni sono stati lavati 2 volte in PBS isotonic a pH 7.4. Durante ciascun lavaggio i tubi sono stati mantenuti 1 ora e 30 minuti in agitazione, a temperatura ambiente per il primo lavaggio (per asportare i residui di colato), a 4°C per il secondo lavaggio. Dopo un lavaggio in NaCl allo 0.9% per 30 minuti, sono stati effettuati due lavaggi in soluzione fisiologica costituita da NaCl allo 0.9% e isopropanolo al 10% per eliminare il colato di sodio ed il Triton. I tubi sono stati mantenuti per 1 ora in agitazione a 4°C. I campioni così ottenuti sono stati infine conservati in PBS o soluzione fisiologica. La rimozione degli acidi nucleici è stata eseguita mediante trattamento con Benzonase prima dei lavaggi finali.

8.2 Trattamento dei lembi decellularizzati prima della semina cellulare

I lembi sono stati disinfettati mediante l'utilizzo di una soluzione antibiotica costituita da fungizone (2.5 µg/ml), cefazolina (240 µg/ml) e vancomicina (50 µg/ml) in terreno DMEM Hepes Modified senza siero. Sono stati effettuati quattro cambi della soluzione ad intervalli di 24 ore ciascuno a 37°C in incubatore..

Per escludere lo sviluppo di contaminazioni da muffe o batteri, i lembi sono stati lasciati dalle 24 alle 48 ore in terreno DMEM Hepes Modified completo di FBS al 10% a 37°C

in incubatore. I lembi sono stati poi posizionati nei pozzetti (*multiwell* da 24, NTC) con la parte ventricularis verso l'alto, e fissati sui bordi da anelli metallici sterili. I campioni sono stati poi stabilizzati in FBS (500 µl/ml per pozzetto) per 12 ore oppure *over night* a 37°C, e successivamente con fattori di adesione, quali la fibronectina bovina (10 µg/cm²) (Calbiochem) per 24 ore, in un volume massimo di 500 µl di PBS.

8.3 Semina delle cellule su lembi valvolari decellularizzati aortici (VDA) e polmonari (VDP)

Le cellule CSP sono state seminate alla densità di 6.5×10^5 cellule/emilembo in 200 µl di terreno DMEM Hepes Modified contenente L-Glutammina, FBS al 10% e soluzione antibiotica APS all'1%. Dopo rimozione del PBS da ciascun pozzetto, 50 µl della sospensione cellulare sono stati aggiunti ad intervalli di 15 minuti a ciascun campione e le matrici sono state mantenute a 37°C durante l'intera operazione di semina. Dopo 30 minuti di incubazione finale a 37°C, sono stati aggiunti 800 µl di terreno di coltura ad ogni campione. Dopo 5 giorni dalla semina, è stato eseguito il primo cambio di terreno nella misura pari al 50% del volume totale. I cambi di terreno successivi sono stati eseguiti a giorni alterni. A determinati intervalli di tempo (7, 14, 28, 35 e 42 giorni), i campioni sono stati fissati per l'analisi morfologica mediante microscopia elettronica a scansione e per lo studio istologico mediante immunofluorescenza e immunisto chimica.

a) Studio morfologico mediante SEM

Le matrici valvolari sono state lavate in PBS 1X, fissate in tampone cacodilato 0.1 M pH 7.2 con glutaraldeide al 3%, e conservati a 4°C fino al momento della disidratazione. Quest'ultima è stata preceduta da tre lavaggi in tampone cacodilato 0.1 M. La disidratazione è stata eseguita per immersione in soluzioni di etanolo al 70% e 90% per 2 ore a temperatura ambiente, sotto agitazione e per una notte in alcool al 95%. I campioni, dopo un passaggio in alcool assoluto, sono stati sottoposti a Critical Point Drying e metallizzati con oro.

I preparati ottenuti sono stati osservati con microscopio elettronico a scansione (modello JSM Jeol 6490) in dotazione presso il Centro Interdipartimentale di Servizi dell'Università di Padova CUGAS.

b) Immunofluorescenza delle matrici VDA e VDP ingegnerizzate

Le matrici VDA e VDP ingegnerizzate sono state risciacquate in PBS e poi incubate per 3 ore, a temperatura ambiente, in una soluzione di saccarosio (Sigma-Aldrich) al 15%. Successivamente, i campioni sono stati fissati per una notte in paraformaldeide al 4%, a 4°C, inclusi in OCT (Carlo Erba Reagenti Spa), congelati con isopentano (Sigma-Aldrich) in azoto liquido e conservati a -20°C fino al taglio con il criostato (Leica, Leitz). Sezioni di 5 µm sono state preparate mediante colorazione con DAPI per l'indagine della distribuzione delle cellule nei supporti VDA e VDP fissate a definiti intervalli di tempo (7, 14, 28, 35 e 42 giorni). In parallelo, altre sezioni sono state utilizzate per lo studio di espressione di marcatori diretti verso componenti della matrice extracellulare, della linea endoteliale e miogenica mediante immunofluorescenza. I campioni sono stati sottoposti a trattamento di 10 minuti, a temperatura ambiente, con una soluzione di Triton X-100 (Sigma-Aldrich) all'1% in PBS per l'indagine di marcatori intracitoplasmatici. La disattivazione dei siti aspecifici è stata eseguita mediante incubazione con PBS contenente BSA al 2% per una notte, a 4°C. È seguito il trattamento per 1 ora, a 37°C, in cameretta umida, con gli anticorpi anti-collagene I (Sigma-Aldrich) (1:500), -collagene IV (Abcam) (1:500), -elastina (Abcam) (1:200), - α -actina (Abcam) (1:100). La rivelazione del legame con l'anticorpo anti- α -actina è stata eseguita mediante immunocitochimica, seguendo la procedura indicata nel paragrafo 4.3b. I campioni trattati con gli anticorpi anti-collagene I, -collagene IV, -elastina sono stati risciacquati in PBS e poi incubati a 37°C, per 30 minuti, in cameretta umida con una soluzione di anticorpo secondario goat anti-rabbit (1:50) e -goat anti-mouse IGG affinity purified, rhodamine conjugated secondary antibody (Millipore) (1:50). Dopo lavaggi con PBS, i campioni sono stati montati con *aqueous mounting medium with DAPI* montante (Vectashield). Le immagini sono state poi acquisite mediante il microscopio a fluorescenza DM2000 e la videocamera Nikon Digital Sight DS-SMC.

RISULTATI

1. Colture cellulari e capacità proliferativa

Le sospensioni cellulari mononucleate CSP, ottenute mediante separazione su gradiente Ficoll, sono state seminate su piastre non condizionate di polistirene. Dopo 7-10 giorni dalla semina, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato la presenza di cellule aderenti di tipo fibroblastoide, organizzate in colonie CFU-F (Figura 17).

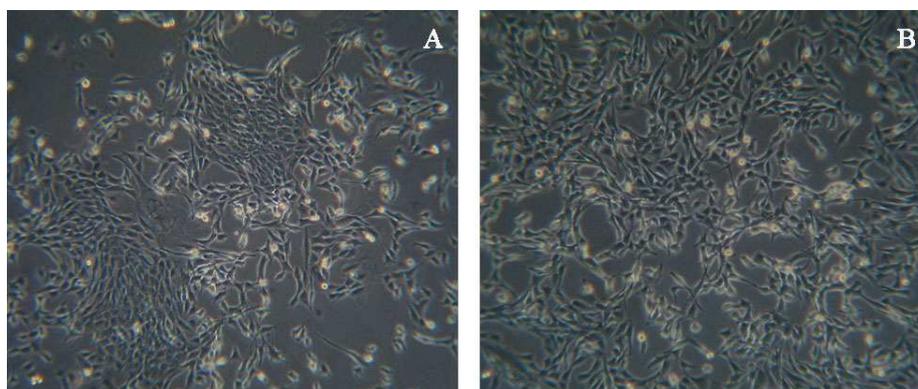


Figura 17. Analisi di microscopia ottica della coltura primaria CSP dopo 7 giorni dalla semina. Ingrandimento: (A) 100X, (B) 200X.

La caratterizzazione morfologica mediante microscopia elettronica a scansione sulle subcolture CSP ha messo in luce la presenza di cellule di grandezza variabile con forma poliedrica o allungata e parzialmente sovrapposte tra di loro. Su tutti gli elementi cellulari sono state osservate sulla membrana tipiche espansioni del tipo microvilli (Figura 18).

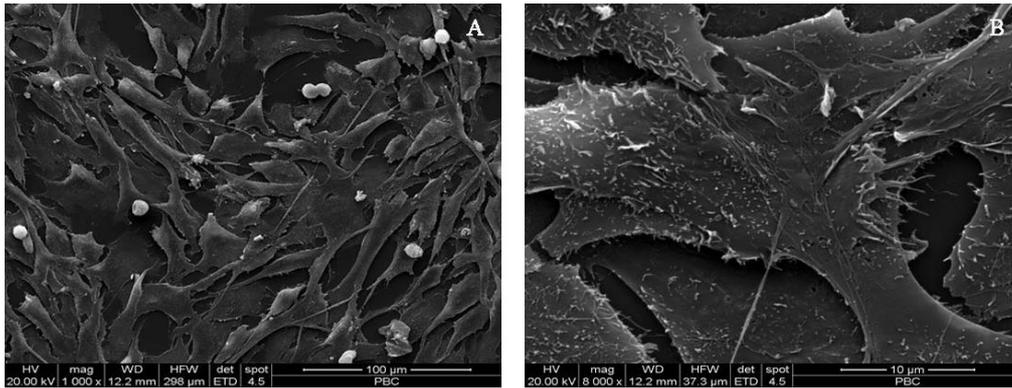


Figura 18. Microscopia elettronica a scansione della subcoltura I di cellule CSP. Ingrandimento: (A) 1000X, (B) 8000X.

Le popolazioni CSP hanno dimostrato un elevato potenziale proliferativo che si è mantenuto costante durante la subcoltura a lungo termine. Dopo 39 passaggi totali, all'analisi di microscopia ottica non sono state rilevate significative alterazioni morfologiche e dimensionali (Figura 19).

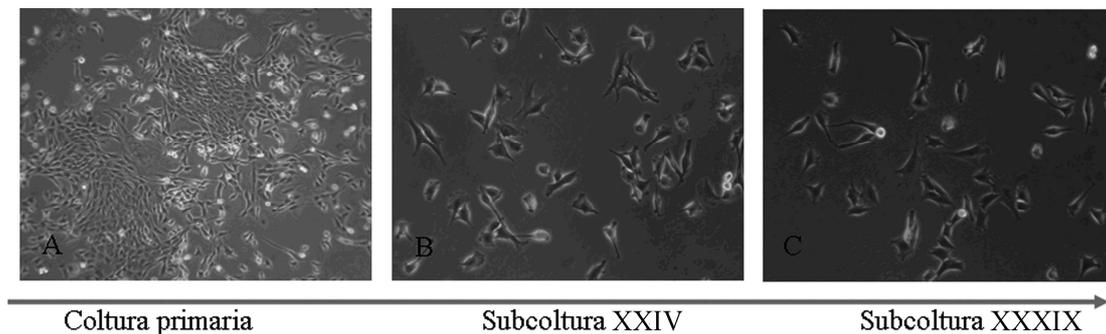


Figura 19. Analisi di microscopia ottica della coltura primaria (A), subcoltura XXIV (B) e XXXIX (C). Ingrandimento: (A) 100X, (B, C) 200X.

Lo studio della crescita a lungo termine è stato eseguito dalla generazione VIII alla XXXIX ed ha previsto la conta cellulare per ogni passaggio dopo 24 ore dalla semina (5×10^3 cellule/cm²). Ogni campione è stato preparato in triplicato e la media dei valori è stata utilizzata per l'identificazione del *doubling population*. Le cellule CSP hanno mostrato una crescita esponenziale durante l'intero periodo di espansione a lungo termine ed hanno eseguito ~ 40 *population doubling* su 31 passaggi totali (Figura 20).

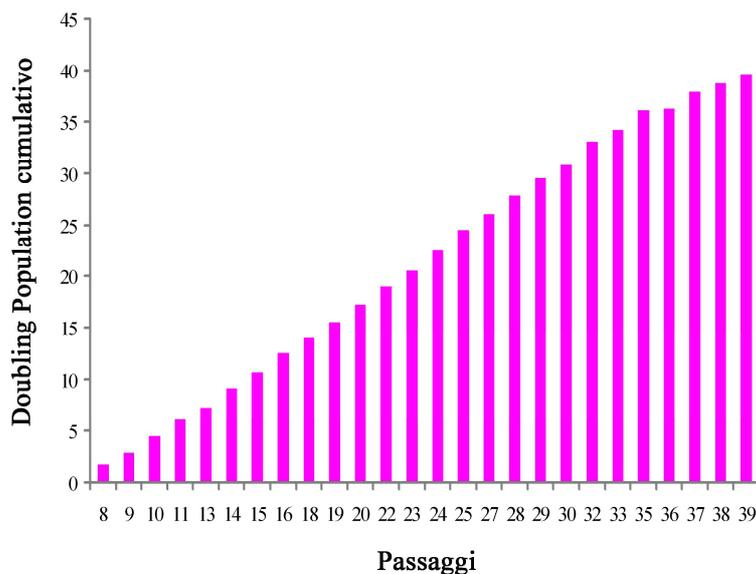


Figura 20. Doubling population cumulativo delle popolazioni CSP. Ogni valore riportato in grafico corrisponde alla media di tre diversi esperimenti.

E' stato osservato che le popolazioni CSP, mantenute alla massima confluenza e in presenza di acido ascorbico (0.05 mM) si organizzano in sincizi cellulari con nuclei allineati, in posizione centrale (Figura 21).

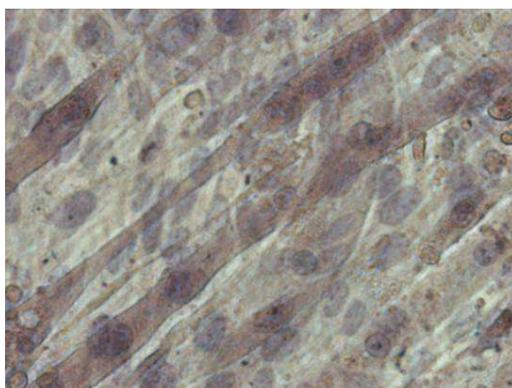
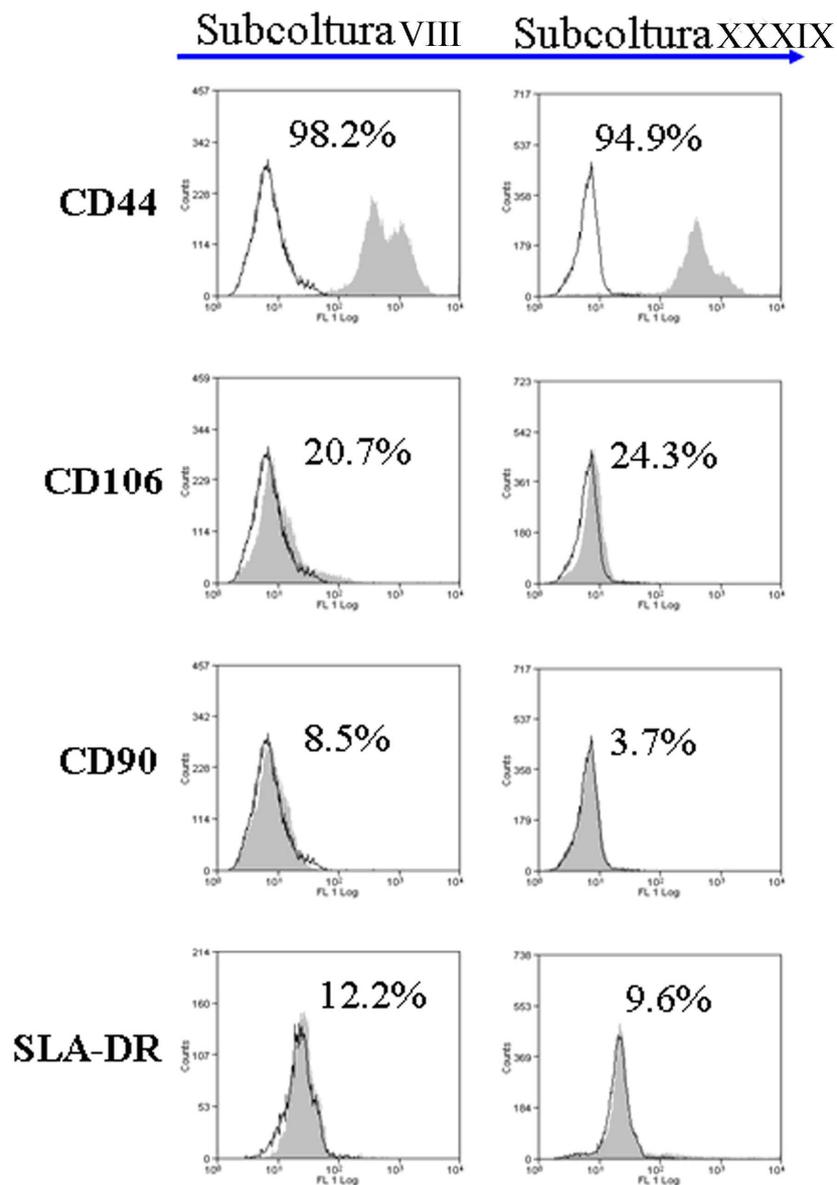


Figura 21. Colorazione di ematossilina/eosina su subcoltura VIII confluenta. Ingrandimento: 400X.

2. Caratterizzazione fenotipica delle cellule CSP mediante citometria e immunocitochimica

L'analisi dell'immunofenotipo mediante citometria (Figura 22A) ha dimostrato che le popolazioni estratte CSP sono positive per i marcatori tipicamente espressi su cellule staminali mesenchimali porcine. Le cellule sono risultate altamente positive per il CD44

(98.2%), per il CD106 (20.7%), per il CD34 (23.2%) e negative all'espressione del CD45 (0%) e del CXCR4 (0.4%). E' stata inoltre evidenziata una bassa espressione per il CD90 (8.5%) e lo SLA-DR (12.2%). Dopo la coltura espansiva, è stato osservato che l'espressione di CD90 e di CD34 tende a decrescere ($p < 0.01$) a valori corrispondenti al 3.7% e 9.4%. L'espressione del marcatore SLA-DR maggiore del 2% è dovuta probabilmente alla reattività cellulare indotta dall'alta concentrazione di FBS nel terreno di coltura.



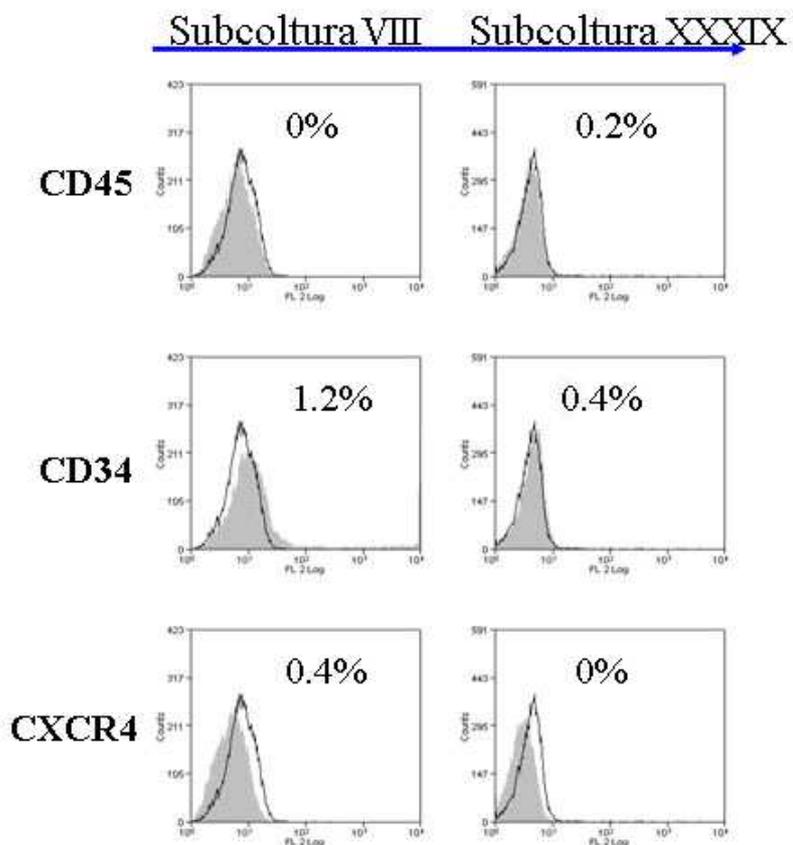


Figura 22A. Caratterizzazione citometrica dell'immunofenotipo delle subcolture VIII e XXXIX. I valori di positività sono riportati come percentuale (%) rispetto al controllo di marcatura. Profilo grigio: trattato; profilo nero: controllo (isotipico o anticorpo secondario coniugato).

Le cellule CSP hanno dimostrato reattività all'anticorpo anti α -actina scheletrica mediante saggio immunocitochimico (Figura 22B).

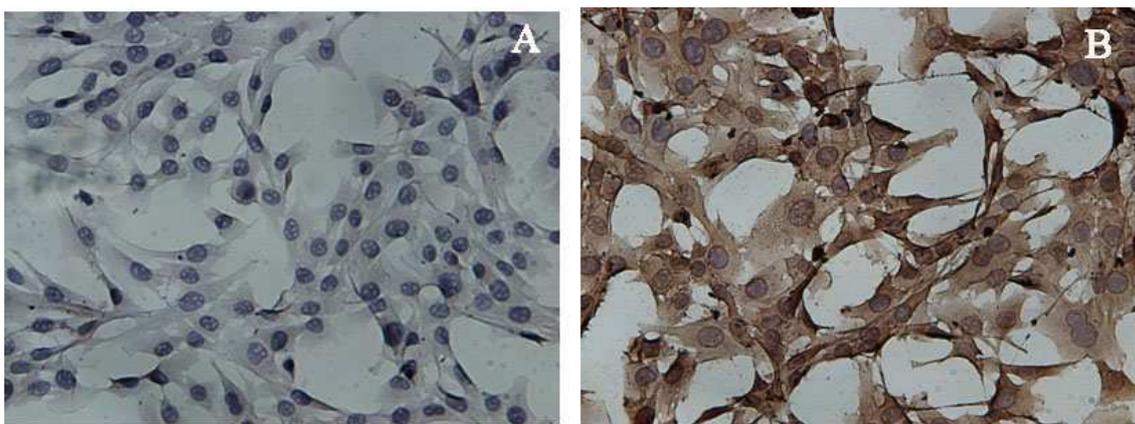


Figura 22B. Valutazione dell'espressione di α -actina su subcoltura VIII mediante analisi immunocitochimica. (A) Controllo negativo, (B) trattato con anticorpo anti α -actina. Ingrandimento: (A), (B) 200X.

3. Caratterizzazione del potenziale multidifferenziativo delle cellule CSP

Il potenziale differenziativo delle subcolture a partire dalla generazione VIII è stato testato mediante stimolazione con terreni specifici induttivi. Tutti i campioni hanno mostrato di rispondere agli stimoli differenziativi in senso adipogenico, osteogenico e cardiomiogenico e tale potenziale si è mantenuto inalterato nella coltura espansiva fino alla generazione XXXIX.

3.1 Differenziamento adipogenico ed osteogenico

Come dimostrato in Figura 23, nei campioni stimolati per 7 e 14 giorni con i fattori adipogenici (insulina, IBMX, DEX e indometacina), sono stati osservati, mediante colorazione Oil Red O, tipici accumuli citoplasmatici di trigliceridi (Figura 23B e C) rispetto al controllo non differenziato (Figura 23A).

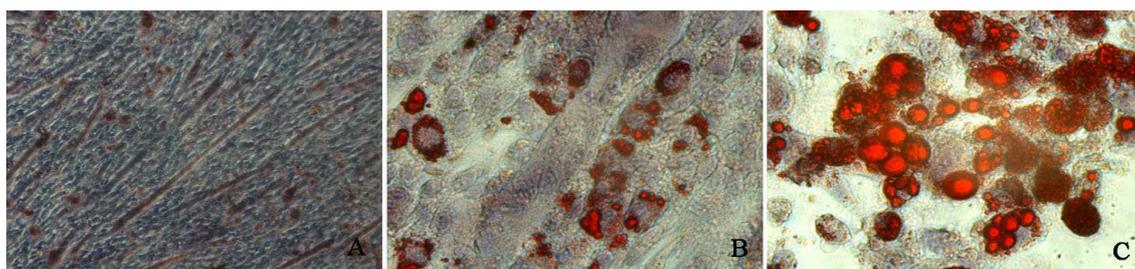


Figura 23. Colorazione Oil Red O su subcoltura VIII dopo 7 giorni (B) e 14 giorni (C) dall'induzione adipogenica. In A, è riportato il controllo indifferenziato. Ingrandimento: (A) 100X, (B, C) 200X.

Dopo stimolazione con i fattori induttivi osteogenici (desametasone, β -glicerofosfato e acido ascorbico), le cellule CSP hanno risposto al trattamento organizzandosi in strutture nodulari a livello delle quali è stata osservata la presenza di sali di calcio mediante la colorazione Von Kossa (Figura 24B). La ridotta produzione di matrice extracellulare mineralizzata è probabilmente dovuta alle condizioni di coltura in assenza di un substrato di collagene. Nel campione di controllo, sono state osservate numerose formazioni sinciziali (Figura 24A).

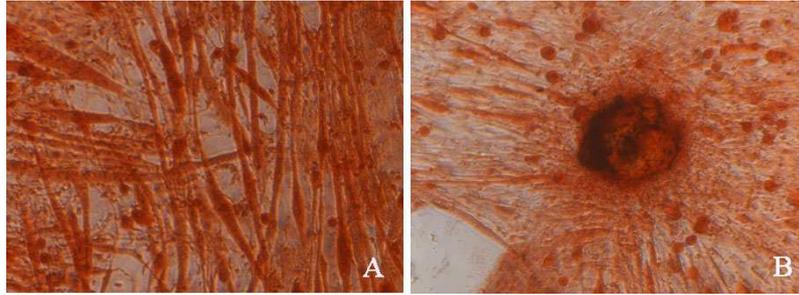


Figura 24. Colorazione Von Kossa su subcoltura VIII dopo 7 giorni dall'induzione osteogenica: (A) controllo indifferenziato, (B) trattato. Ingrandimento: (A, B) 200X.

3.2 Differenziamento cardiomiogenico

a) Caratterizzazione morfologica mediante SEM

Dopo 7 giorni dall'induzione di differenziamento cardiomiogenico, all'analisi di microscopia elettronica a scansione, le cellule CSP hanno mostrato, rispetto al controllo indifferenziato (Figura 25A), una morfologia allungata, con distribuzione parallela tra di loro (Figura 25B) e numerose piccole estroflessioni della membrana citoplasmatica (Figura 25C). Dopo 14 giorni dal trattamento, le cellule sono risultate di forma poliedrica e organizzate in un monostrato continuo (Figura 25E). Sulla superficie cellulare si è mantenuta la presenza di microvilli e negli spazi intercellulari sono state osservate fibre di collagene (Figura 25F). Nel campione di controllo (Figura 25D), il monostrato si è rivelato discontinuo e le cellule hanno rivelato una morfologia meno allungata con numerose estroflessioni.

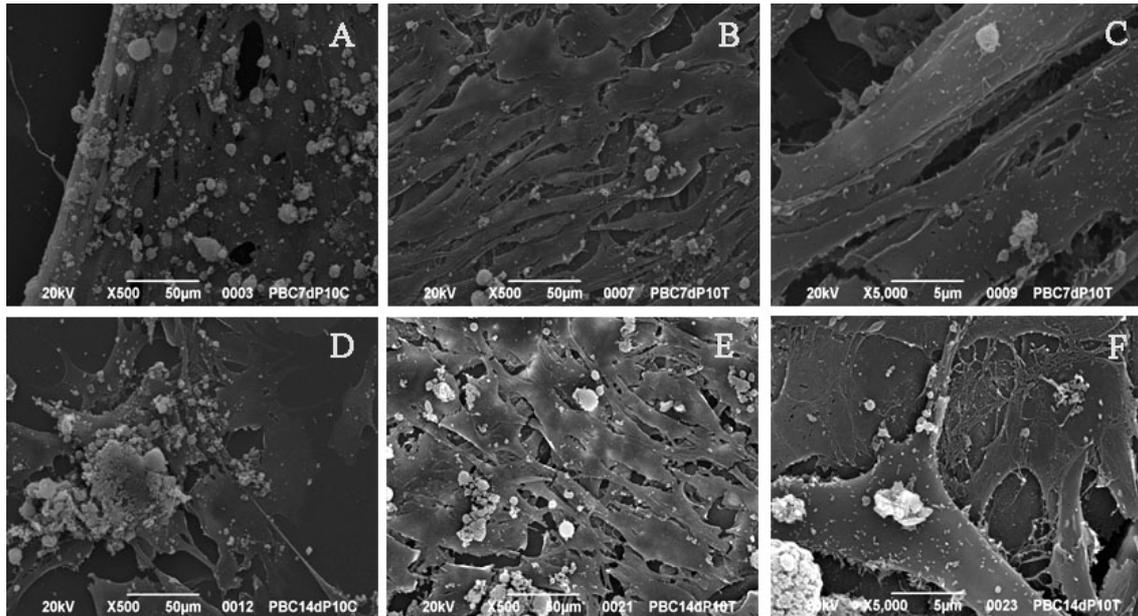


Figura 25. Analisi di microscopia elettronica a scansione su subcolture VIII dopo 7 giorni (B, C) e 14 giorni (E, F) dall'induzione cardiomiogenica. In (A) e (D) sono riportati i controlli indifferenziati relativi, rispettivamente, ai 7 e 14 giorni. Ingrandimento: (A, B, D, E) 500X, (C, F) 5000X.

b) RT-PCR

Per indagare il *commitment* delle cellule CSP in senso cardiomiogenico dopo trattamento con 5-AZA, ad intervalli di 7 (Figura 26B) e 14 giorni (Figura 26C) è stata valutata l'espressione genica per la catena leggera della miosina (MLC; isoforma cardiaca MLC5f), l' α -actina scheletrica, la catena pesante cardiaca della miosina (MHC) e la desmina. L'analisi degli amplificati su gel di agarosio ha evidenziato la presenza nei campioni indifferenziati (Figura 26A) di messaggeri specifici per la MLC (banda di 440 pb) e la MHC (banda di 430 pb). La coppia di primer utilizzata per lo studio di espressione dell' α -actina scheletrica ha consentito l'amplificazione di due sequenze di grandezza diversa: una banda di 480 pb, corrispondente alla lunghezza del frammento atteso e una seconda di 300 pb, isoforma porcina. Nei campioni trattati, è stata osservata l'espressione dell'isoforma MLC5f e un aumento di espressione della isoforma dell' α -actina di 300 pb. Non è stata osservata una significativa espressione di desmina nei campioni di controllo e di trattato.

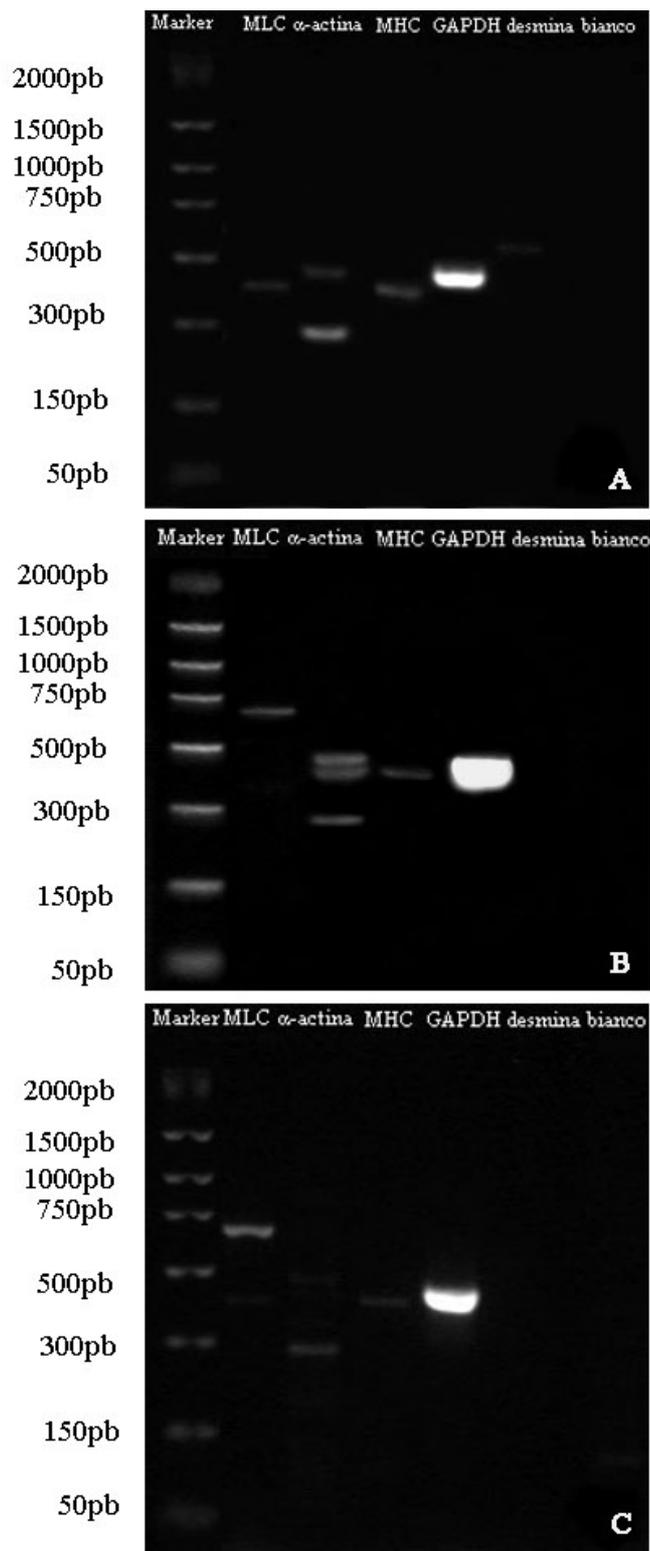


Figura 26. Studio di espressione mediante RT-PCR di MLC, α -actina scheletrica, MHC cardiaca, desmina e visualizzazione degli amplificati su gel di agarosio 2%. GAPDH: gene housekeeping; Bianco: controllo negativo.

c) Immunofluorescenza e Western Blotting

Come riportato in Figura 27, dopo 7 e 14 giorni dal trattamento con l'agente 5-AZA, nelle subcolture CSP è stata osservata, mediante immunofluorescenza, l'espressione di specifici marcatori di linea cardiomiogenica, quali l' α -actina muscolo specifica (Figura 27B, C), la troponina cardiaca T (Figura 27E, F) e fosfolambano (Figura 28B, C). Nessun segnale di fluorescenza è stato osservato nei campioni di controllo indifferenziato (Figura 27A, D; Figura 28A).

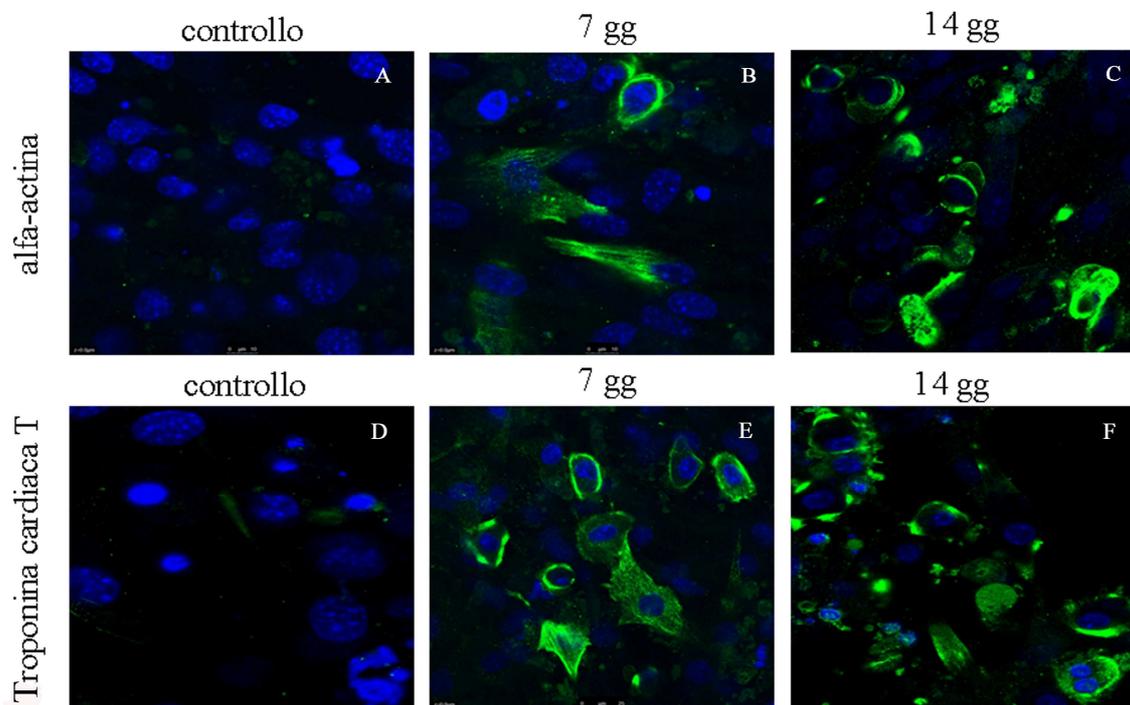


Figura 27. Caratterizzazione mediante immunofluorescenza dell'espressione di alfa-actina (A, B, C) e Troponina cardiaca T (D, E, F) su subcoltura VIII dopo 7 (B, E) e 14 giorni (C, F) dall'induzione cardiomiogenica. In (A) e (D) sono riportati i controlli indifferenziati. Ingrandimento: 630X.

Per confermare il dato di immunofluorescenza ottenuto per il fosfolambano, è stato eseguito uno studio di espressione proteica. I lisati cellulari sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. Nei campioni trattati è stata osservata una banda di 25 KDa, corrispondente alla grandezza del fosfolambano nella forma pentamerica. (Figura 28D).

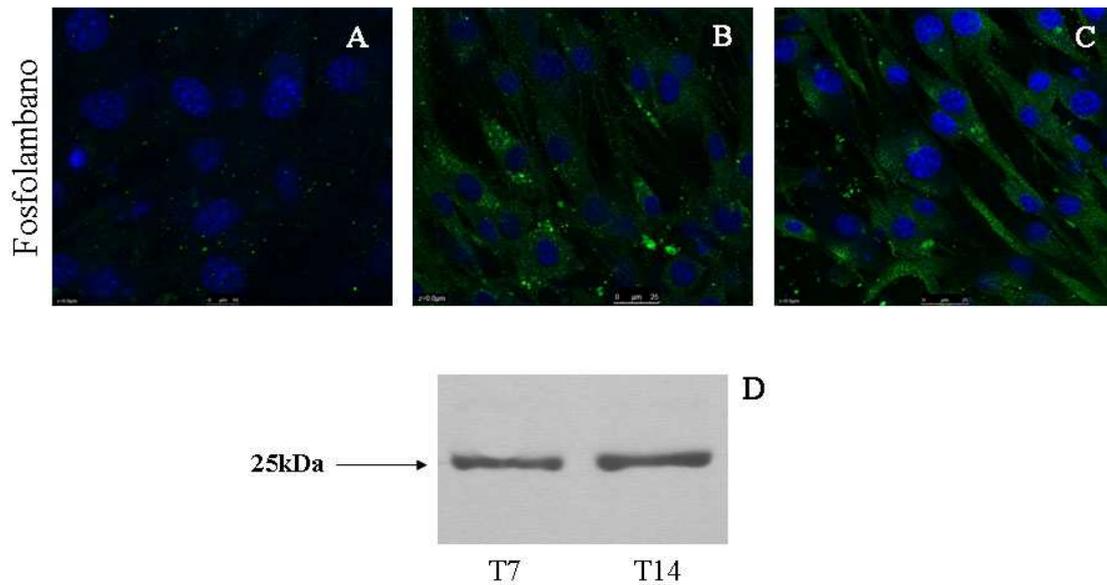


Figura 28. Caratterizzazione dell'espressione di fosfolambano mediante immunofluorescenza (A, B, C) e Western Blotting (D) su subcoltura VIII dopo 7 (B, D) e 14 giorni (C, D) dall'induzione cardiomiogenica. In (A) è riportato il controllo indifferenziato. Ingrandimento: (A, B, C) 630X.

4. Crescita delle CSP su matrici valvolari decellularizzate

Allo scopo di valutare le potenzialità di impiego in campo cardiologico di cellule circolanti $CD44^{high}$, $CD106^{+}$, $CD90^{low}$, $SLA-DR^{low}$, $CD45^{-}$, $CD34^{-}$, $CXCR4^{-}$, è stata oggetto di studio la crescita delle popolazioni CSP su matrici porcine valvolari (aortiche e polmonari) decellularizzate (VDA, VDP). Uno studio preliminare di microscopia elettronica a scansione sulle matrici VDA e VDP ha confermato l'assenza di corpi cellulari sulla superficie valvolare (Figura 29).

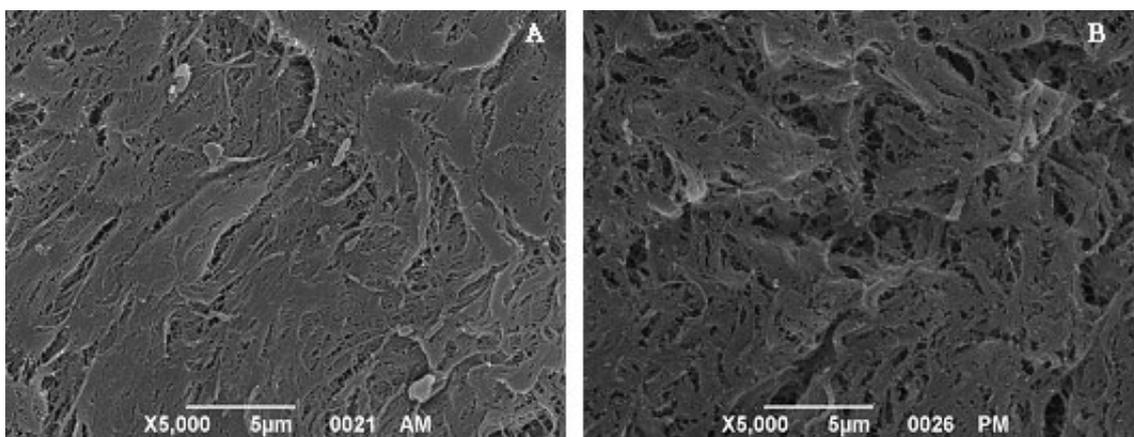


Figura 29. Analisi SEM delle valvole decellularizzate VDA e VDP. Ingrandimento: (A, B) 5000X.

Il procedimento detergente enzimatico TRICOL è un metodo di decellularizzazione efficace che non altera le caratteristiche strutturali coinvolte nell'adesione cellulare alla

matrice extracellulare (Spina *et al.*, 2003). All'analisi SEM, dopo 7 giorni dalla semina, le cellule CSP sono risultate adese ai supporti VD e organizzate in modo orientato sull'intera superficie ventricolare (Figura 30A, B). A tempi successivi (14 giorni), una differente morfologia cellulare è stata osservata nelle colture: le cellule seminate su matrice VDA sono apparse più piccole e di forma più irregolare rispetto ai campioni preparati sul supporto VDP (Figura 30C, D). Le cellule CSP hanno conservato le caratteristiche estroflessioni della membrana cellulare dopo la semina su entrambi i tipi di matrici (Figura 30a, b) ed il numero di microvilli sembra aumentare nel corso della coltura (Figura 30c, d).

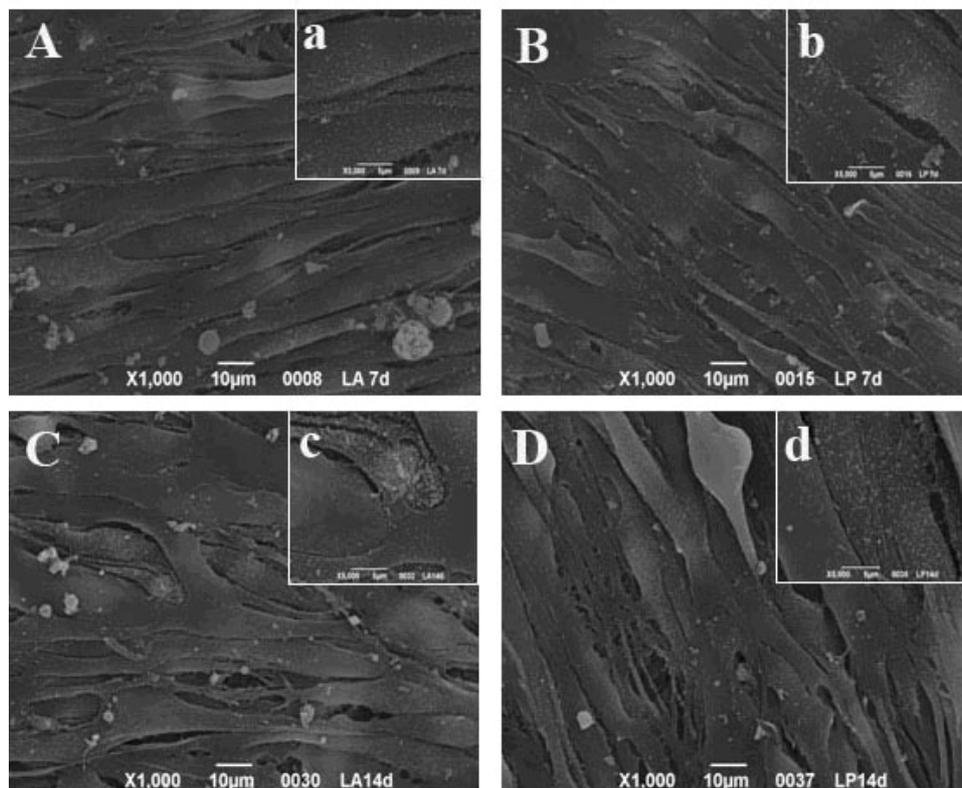


Figura 30. Analisi SEM delle cellule CSP su matrici valvolari decellularizzate VDA (A, a, C, c) e VDP (B, b, D, d) dopo 7 (A, a, B, b) e 14 giorni (C, c, D, d) dalla semina. Ingrandimento: (A, B, C, D) 1000X, (a, b, c, d) 5000X.

Nei campioni analizzati dopo 28 e 35 giorni dalla semina, le cellule su VDA hanno una morfologia nastriforme e una distribuzione ordinata e parallela (Figura 31 A). Al contrario, sui campioni preparati su VDP le cellule sono apparse significativamente di dimensioni maggiori e con forma poliedrica (Figura 31 B), Tra le cellule sono stati osservati numerosi legami intercellulari (Figura 31 a, b). Numerose cellule sono state osservate anche sul lato basale della matrice VDA.

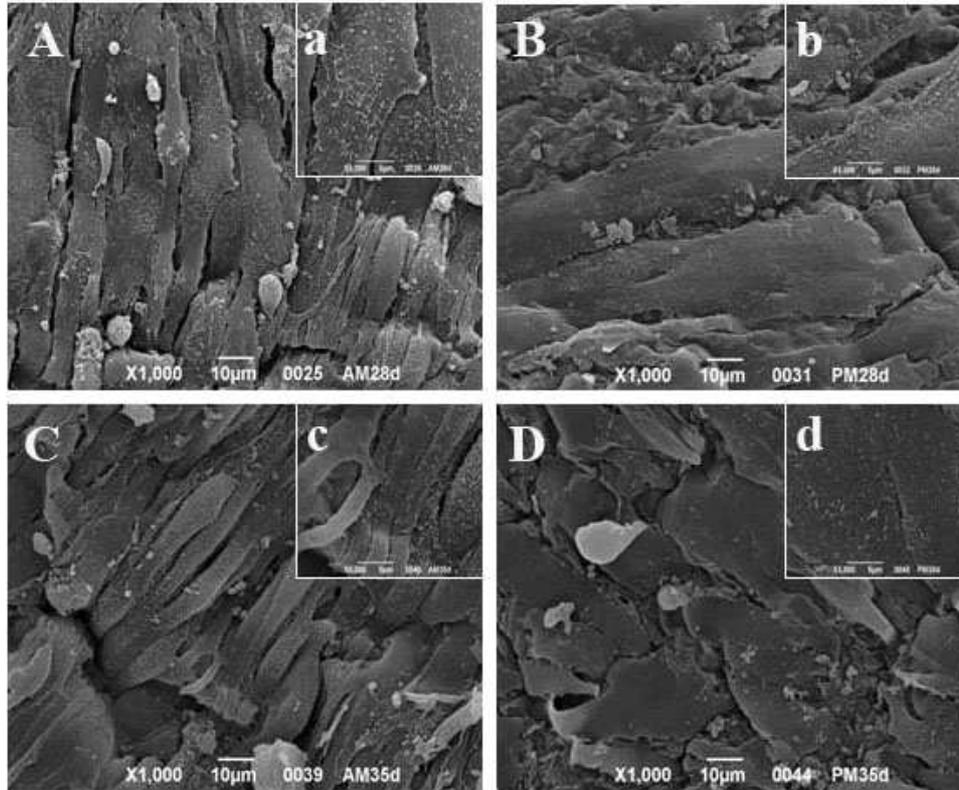


Figura 31. Analisi SEM delle cellule CSP su matrici valvolari decellularizzate VDA (A, a, C, c) e VDP (B, b, D, d) dopo 28 (A, a, B, b) e 35 giorni (C, c, D, d) dalla semina. Ingrandimento: (A, B, C, D) 1000X, (a, b, c, d) 5000X.

Il monostrato cellulare è risultato integro sulla superficie ventricolare di VDA e VDP per tutta la durata della coltura *in vitro* (42 giorni) (Figura 32A, B). Solo sulle matrici VDA si è distribuito anche sulla superficie fibrosa (Figura 32C, D).

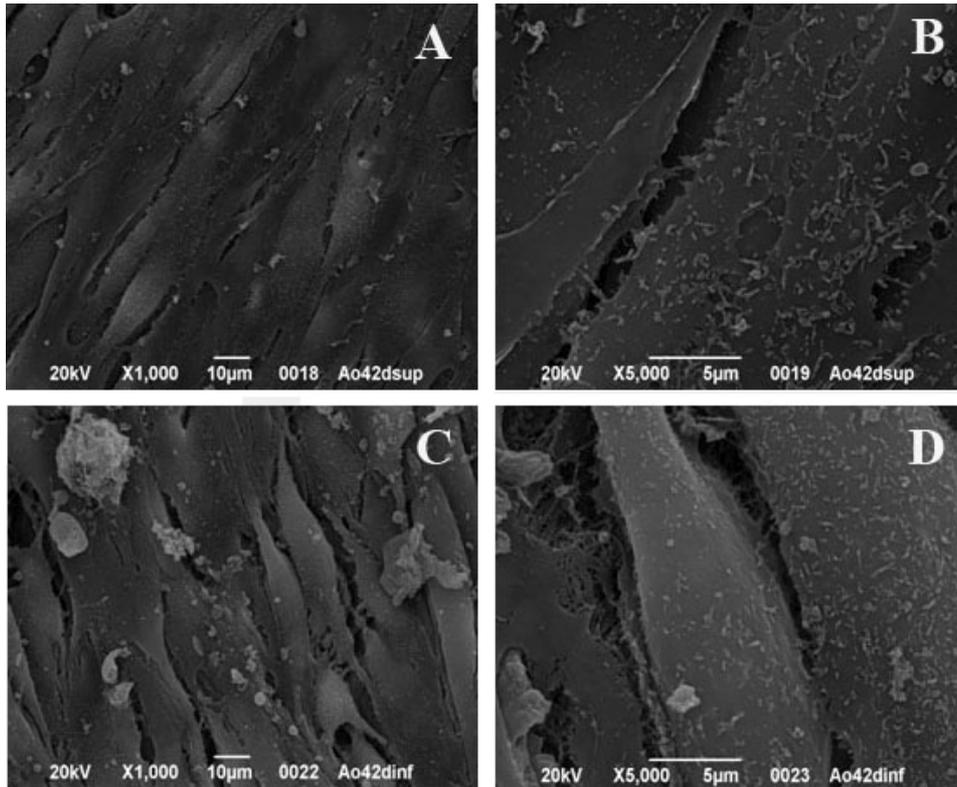


Figura 32. Analisi SEM delle cellule CSP sulla superficie ventricolare (A, B) e fibrosa (C, D) di matrici valvolari VDA dopo 42 giorni dalla semina. Ingrandimento: (A, C) 100X, (B, D) 5000X.

Non è stata osservata alcuna colonizzazione a tutto spessore delle matrici VD da parte delle cellule CSP (Figura 33), come dimostrato, a differenti intervallo di tempo dalla semina, su sezioni istologiche colorate con DAPI.

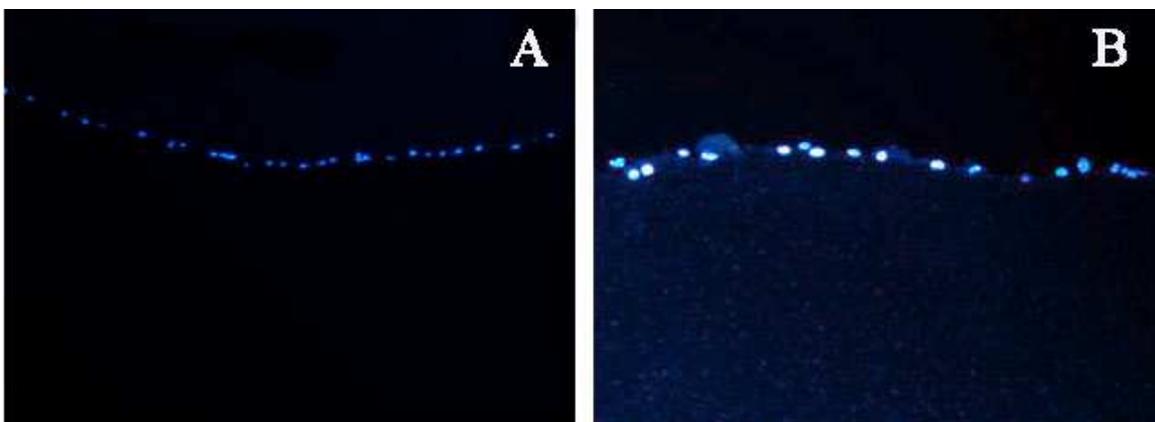


Figura 33. Valutazione della distribuzione delle cellule CSP su matrici VDA (A) e VDP (B) mediante colorazione con DAPI. Ingrandimento: (A) 100X, (B) 200X.

Lo studio istologico mediante immunofluorescenza sui campioni preparati con le matrici VD e le cellule CSP ha evidenziato nei supporti la presenza di elastina (Figura 34A), collagene IV (Figura 34B) e collagene I (Figura 34C).

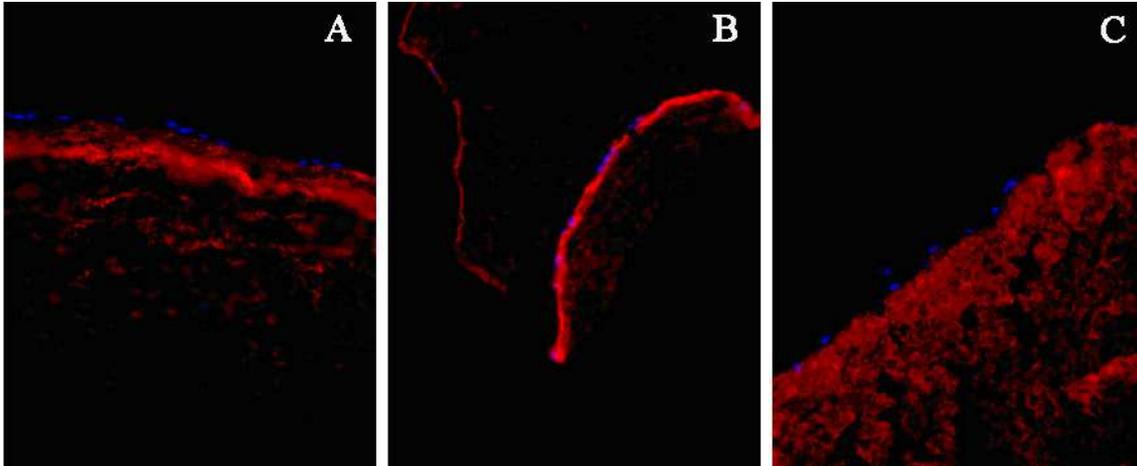


Figura 34. Analisi di immunofluorescenza di elastina, collagene IV e collagene I sulle matrici valvolari VDA dopo 42 ore dalla semina. Ingrandimento: 200X.

Inoltre, all'analisi di immunohistochimica con l'anticorpo specifico, le cellule CSP hanno mostrato l'espressione di α -actina (Figura 35). I siti specifici sono stati rivelati con il reagente DAB.

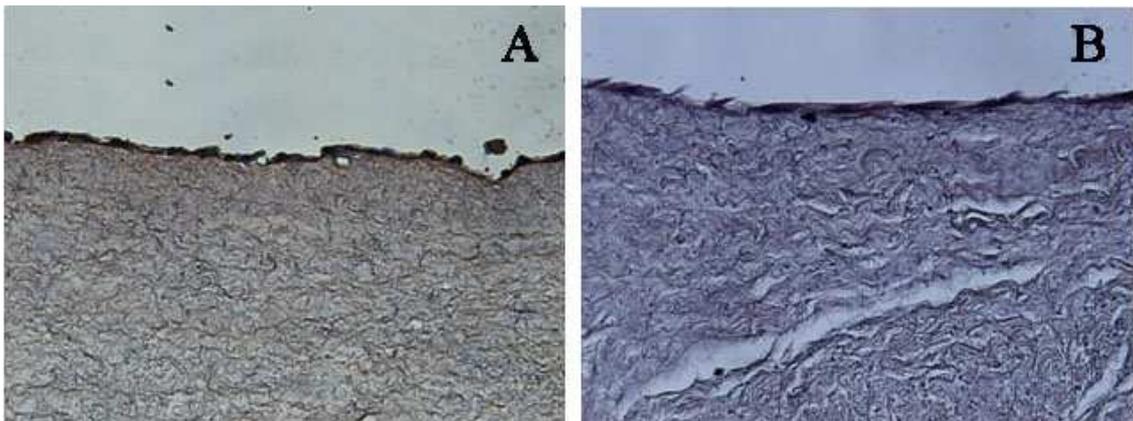


Figura 35. Valutazione dell'espressione di α -actina mediante immunohistochimica su cellule CSP coltivate per 42 giorni su matrici VDA (A) e VDP (B). Ingrandimento: 200X.

Ulteriori studi mediante immunofluorescenza, Western Blotting e RT-PCR saranno eseguiti per meglio caratterizzare il fenotipo delle cellule CSP dopo crescita sulle matrici valvolari aortiche e polmonari.

DISCUSSIONE

Nell'ultimo decennio, le cellule staminali multipotenti (CSM) hanno suscitato un grande interesse nella comunità scientifica, sia per le implicazioni che il loro studio comporta sul piano della ricerca di base sia per la molteplicità di impiego terapeutico che le contraddistingue (Pittenger *et al.*, 1999). Attualmente, esse sono utilizzate con successo quale modello cellulare per lo studio di *pathway coinvolti nel* differenziamento cellulare, nella rigenerazione tessutale e nella risposta cellulare ai trattamenti farmacologici. Purtroppo, sebbene sia indiscusso il loro potenziale terapeutico, le cellule multipotenti isolate da materiale fetale post-natale o da tessuti embrionali sono di difficile impiego in clinica a causa delle problematiche di ordine etico o del possibile rischio immunologico associato al loro trapianto in modalità eterologa. Alla luce di quanto riportato, l'uso di cellule staminali adulte, estratte da tessuti extramidollari e idonee al trapianto autologo, potrebbe dettare una svolta significativa nel campo della medicina rigenerativa. In questa prospettiva, il sangue periferico (SP), accanto al tessuto adiposo, alla cute e al midollo osseo, rappresenterebbe una fonte ideale di cellule CSM perché è di facile accesso, garantisce una sorgente inesauribile di cellule staminali durante il corso della vita, non comporta procedure estrattive di tipo invasivo per il paziente ed il suo utilizzo non solleva problemi etici. In letteratura numerose evidenze sperimentali sono state accumulate sulla presenza di cellule fibroblastoidi circolanti nel sangue periferico e caratterizzate da alta plasticità differenziativa. Nel 2003, Kuwana e collaboratori hanno identificato una popolazione cellulare, detta MOMC (*monocyte-derived multipotential cells*), positiva per il CD14, il CD45, il CD34 e il collagene di tipo I. La popolazione è stata ottenuta *in vitro* a partire da cellule mononucleate di sangue periferico umano, coltivate su fibronectina, in presenza di siero fetale bovino. Possiedono capacità multidifferenziativa in senso osteogenico, miogenico, condrogenico e adipogenico, possono essere espanse *in vitro* per cinque passaggi senza accumulare alterazioni fenotipiche. Cellule circolanti a differente grado differenziativo sono state identificate in diverse specie animali: per esempio, progenitori endoteliali, isolati da sangue periferico di pecora, sono stati espansi *ex vivo* e successivamente utilizzati per ingegnerizzare arterie iliache porcine decellularizzate mediante trattamenti ripetuti con Triton X-100 e idrossido di ammonio (Kaushal *et al.*, 2001). Dopo impianto *in vivo*, hanno dimostrato una funzionalità contrattile e simil endoteliale.

Più recentemente, cellule multipotenti isolate da sangue periferico porcino sono state immortalizzate e caratterizzate (Wang e Moutsoglou, 2009). La loro potenzialità differenziativa è risultata *in vitro* specifica per la linea osteogenica ed adipogenica. Il loro immunofenotipo ha rivelato analogie con quello caratteristico delle cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo porcino. Lo studio di citofluorimetria ha infatti dimostrato la loro positività per i marcatori CD44 (92.83%), CD90 (94.13%), collagene di tipo I (97.49%), vimentina (96.50%) e la loro negatività per il CD14 (4.29%) e l'antigene MHC di classe II (7.26%).

L'identificazione di tipologie cellulari diverse a partire dalla stessa sorgente staminale è probabilmente da ritenersi dipendente dalla diversa procedura sperimentale impiegata. Secondo la *International Society for Cellular Therapy* (Dominici *et al.*, 2006), le cellule staminali multipotenti possono essere classificate come tali qualora la procedura di isolamento rispetti criteri minimi, quali la semina della popolazione primaria su piastre non condizionate, l'espressione di un definito immunofenotipo contraddistinto da a) alta espressione per il CD73, CD105, CD90, b) negatività per i marcatori di linea ematopoietica, quali il CD34, CD45, CD14, CD79a, e, per concludere, c) plasticità *in vitro* verso la linea adipogenica, osteogenica e condrogenica. In questa tesi, è stata definita una procedura sperimentale per l'isolamento di cellule plastiche, circolanti nel sangue periferico di maialino nano vietnamita (*minipig*) (CSP). In accordo con le linee guida internazionali di terapia cellulare, le cellule mononucleate sono state separate mediante centrifugazione su Ficoll e selezionate per adesione alla plastica, in un terreno di coltura formato da alfa-MEM, siero bovino fetale e soluzione antibiotica. Dopo circa sette giorni dalla semina, sono state osservate caratteristiche unità formanti colonie del tipo fibroblastoide (CFU-F) nell'80% delle colture primarie. Dopo il distacco dalla piastra mediante trattamento enzimatico di EDTA-tripsina, le cellule sono state espanse per 39 generazioni, in piastre di polistirene non condizionate. Il doubling population cumulativo osservato è stato di ~ 40, similmente a quanto riportato per le cellule staminali midollari (Liu *et al.*, 2004). L'immunofenotipo delle CSP, studiato mediante citometria, è risultato caratterizzato dalla presenza di CD44^{high}, CD106⁺, CD90^{low}, SLA-DR^{low}, CD45⁻, CD34⁻, CXCR4⁻. I livelli di espressione sono risultati stabili nel corso della coltura espansiva a lungo termine, unitamente alle caratteristiche morfologiche, come dimostrato dall'analisi di microscopia ottica. Le cellule CSP presentano, dunque, molte analogie con le cellule staminali midollari, sia per la capacità espansiva *in vitro* che per il loro potenziale differenziativo. Le cellule staminali midollari porcine (Liu *et*

al., 2004) sono caratterizzate dall'alta espressione per il CD44, il CD90, l'antigene MHC di classe I e lo SWC3A. Risultano invece negative per il marcatore MHC di classe II e per il CD45. Se sottoposte a stimolo specifico con l'agente 5-azacitidina, sono in grado di differenziare *in vitro* in cardiomiociti, esprimendo geni per proteine muscolo specifiche, quali il fosfolambano, l'alfa-actina muscolo specifica e la desmina. Il trapianto autologo di cellule staminali midollari porcine, in combinazione con una matrice di fibrina, si è dimostrato una strategia efficace per il riparo del danno miocardico in un modello di infarto porcino (Liu *et al.*, 2004). Nel midollo osseo, estratto da maiale, popolazioni cellulari esprimenti alti livelli di CD90 e CD106 sono state isolate e caratterizzate in modelli *in vivo* nel recupero di danni cardiaci (Kuo *et al.*, 2009). Inoltre, il loro trapianto in combinazione con altre popolazioni cellulari di linea ematopoietica ha dimostrato di essere efficace nel garantire un maggiore attecchimento dell'allotrapianto cellulare (Kuo *et al.*, 2009).

La specifica induzione con terreni differenziativi in senso adipogenico, osteogenico e cardiomiogenico ha dimostrato che le cellule CSP sono cellule plastiche, che rispondono agli stimoli in modo specifico accumulando trigliceridi, producendo matrice extracellulare mineralizzata ed esprimendo marcatori cardiomiogenici quali il fosfolambano, l'alfa-actina muscolo specifica e la troponina cardiaca T. In particolare è stato osservato che nei campioni trattati con 5-AZA si attiva l'espressione di MLC5f, isoforma della catena leggera della miosina risultante da uno splicing alternativo del trascritto MYL1 e tipicamente espressa a livello del muscolo scheletrico (Ling *et al.*, 2010). Allo scopo di valutare le potenzialità di impiego in campo cardiologico di popolazioni circolanti aventi l'immunofenotipo CD44^{high}, CD106⁺, CD90^{low}, SLA-DR^{low}, CD45⁻, CD34⁻, CXCR4⁻, è stata oggetto di studio la crescita delle cellule CSP su matrici valvolari decellularizzate (VD) aortiche e polmonari. La valutazione dell'adesione cellulare al substrato è stata eseguita mediante analisi SEM a differenti intervalli di tempo (7, 14, 28, 35 e 42 giorni). Lo studio morfologico ha dimostrato la colonizzazione della superficie di semina da parte delle cellule CSP e la loro organizzazione in monostrati continui, in cui le cellule, esprimenti microvilli simili a quelli caratteristici delle cellule dell'endocardio, assumono una morfologia nastriforme sulla matrice VDA e più poliedrica su VDP. Lo studio istologico mediante immunofluorescenza ha inoltre evidenziato sui campioni la presenza di elastina e di collagene (IV e I) mentre lo studio immunoistochimico ha dimostrato la positività delle cellule per l'alfa-actina cellulare scheletrica.

Alla luce di tali risultati è possibile concludere che le cellule isolate CSP presentano caratteristiche peculiari di crescita e plasticità che consentirebbero la preparazione di sostituti tessutali per l'impiego in applicazioni di medicina rigenerativa. Successivi studi, valuteranno in modelli animali l'efficacia delle valvole acellulari VD ingegnerizzate con cellule CSP e una valutazione più accurata del *commitment* cellulare indotto dalla matrice di supporto sarà eseguita mediante analisi di microRNA.

BIBLIOGRAFIA

Abe R., Donnelly S.C., Peng T. et al. (2001): Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *The Journal of Immunology*, 166: 7556-7562.

Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964-967.

Auernhammer C.J., Melmed S. (2000): Leukemia-inhibitory factor neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev*, 21: 313-345.

Aukrust P., Ueland T., Lien E. et al. (1999): Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 83: 376-382.

Bin F., Yinglong L., Nin X. et al. (2006): Construction of tissue-engineered homograft bioprosthetic heart valves in vitro. *ASAIO J*, 52: 303-309.

Bittira B., Kuang J.Q., Al-Khaldi A., Shum-Tim D., Chiu R.C. (2002): In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg*, 74: 1154-1159.

Bonow R.O., Carabello B., de Leon A.C. Jr. et al. (1998): ACC/AHA Guidelines for the management of patients with valvular heart disease: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on management of patients with valvular heart disease). *Circulation*, 98: 1949-1984.

Braunwald E. (1997): Valvular heart disease. In Braunwald E. 'Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine', *W.B. Saunders Co., Philadelphia*, 1007-1076.

Brody S., Pandit A. (2007): Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 83: 16-43.

Bucala R., Spiegel L.A., Chesney J. et al. (1994): Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular Medicine*, 1: 71-81.

Burchfield J.S., Dimmeler S. (2008): Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis e Tissue Repair*, 1: 4.

Cheng L., Xiao L. (2009): Pig induced pluripotent stem cells: a new resource for generating genetically modified pigs. *Regen Med*, 4: 787-789.

Dare A.J., Veinot J.P., Edwards W.D., Tazelaar H.D., Schaff H.V. (1993): New observations on the etiology aortic valve disease: a surgical pathologic study of 236 cases from 1990. *Hum Pathol*, 24: 1330-1338.

Davidson J.M. (1992): Wound repair. 2nd ed. In: Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R. (eds). *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Raven Press, New York, 809-819.

Dawn B., Tiwari S., Kucia M.J. et al. (2008): Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *STEM CELLS*, 26: 1646-1655.

Dimmeler S.A., Zeiher M., Schneider M.D. (2005): Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*, 115: 572-583.

Diwan S.B., Stevens L.C. (1976): Development of teratomas from ectoderm of mouse egg cylinders. *J Natl Cancer Inst*, 57: 937-942.

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317.

Donovan P.J., Gearhart J. (2001): The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 414: 92-97.

Dunphy J.E. (1963): The fibroblast-A ubiquitous ally for the surgeon. *N Engl J Med*, 268: 1367-1377.

Edwards J.E. (1961): The congenital bicuspid aortic valve. *Circulation*, 23: 485- 488.

Ernst M., Jenkins B.J. (2004): Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet*, 20: 23-32.

Eschenhagen T., Zimmermann W.H. (2005): Engineering myocardial tissue. *Circ Res*, 97: 1220-1231.

Estes B.T., Gimble J.M., Guilak F. (2004): Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Curr Top Dev Biol*, 60: 91-126.

Evans M.J., Kaufman M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.

Filová E., Straka F., Mirejovský T., Masín J., Bacáková L. (2009): Tissue-engineered heart valves. *Physiol Res*, 58: S141-S158.

Fleg J.L. (1986): Alterations in cardiovascular structure and function with advancing age. *Am J Cardiol*, 57: 33C-44C.

Frangogiannis N.G., Smith C.W., Entman M.L. (2002): The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 53: 31-47.

Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3: 393-403.

Friedenstein A. J., Goskaja U.F., Julagina N.N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4: 267-274.

Gianni A.M., Siena S., Bregni M., Tarella C., Stern A.C., Pileri A., Bonadonna G. (1989): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*, 2: 580-585.

Gnecchi M., He H., Liang O.D., Melo L.G., Morello F., Mu H., Noiseux N., Zhang L., Pratt R.E., Ingwall J.S, Dzau V.J. (2005): Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*, 11: 367-368.

Gong Z., Niklason L.E. (2008): Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *FASEB J*, 22: 1635-1648.

Gordon S. (1995): The macrophage. *Bioessays*, 17: 977-986.

Grauss R.W., Hazekamp M.G., Oppenhuizen F., van Munsteren C.J., Gittenbergerde Groot A.C., DeRuiter M.C. (2005): Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*, 27: 566-571.

Guillot P.V., Cui W., Fisk N.M., Polak D.J. (2007): Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med*, 11: 935-944.

Hammermeister K., Sethi G.K., Henderson W.G., Grover F.L., Oprian C., Rahimtoola S.H. (2000): Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial. *J Am Coll Cardiol*, 36: 1152-1158.

Hattan N., Kawaguchi H., Ando K., Kuwabara E., Fujita J., Murata M. et al. (2005): Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovascular Research*, 65: 334-344.

He Q., Wan C., Li G. (2007): Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *STEM CELLS*, 25: 69-77.

Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., Hill D., Strutt B., Thyssen S., Gray D.A., Bhatia M. (2003): Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nature Biotechnology*, 21: 763-770.

Hishinuma S., Funamoto M., Fujio Y., Kunisada K., Yamauchi-Takahara K. (1999): Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 264: 436-440.

Honge J.L., Funder J., Hansen E. et al. (2010): Recellularization of aortic valves in pigs. *Eur J Cardiothorac Surg*.

Huss R., Lange C., Weissinger E.M. et al. (2000): Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cells characteristics. *STEM CELLS*, 18: 252-260.

Iop L., Renier V., Naso F., Piccoli M., Bonetti A., Gandaglia A. et al. (2009): The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. *Biomaterials*, 30: 4104-4116.

Iung B., Baron G., Butchart E.G. et al. (2003): A prospective survey of patients with valvular heart diseases in Europe: the Euro Heart Survey on valvular heart disease. *Euro Heart J Jul*, 24: 1231-1243.

Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., et al. (2002): Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 30: 896-904.

Kaushal S., Amiel G.E., Guleserian K.J. et al. (2001): Functional small diameter neovessels using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*, 7: 1035-1040.

Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H., Yamaguchi J.I., Uchida S., Masuda H. et al. (2001): Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 103: 634-637.

Kawamoto A., Tkebuchava T., Yamaguchi J., Nishimura H., Yoon Y.S., Milliken C. et al. (2003): Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 107: 461-468.

Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *STEM CELLS*, 24: 1294-1301.

Ketchedjian A., Jones A.L., Krueger P., Robinson E., Crouch K., Wolfinbarger L.J. et al. (2005): Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions. *Ann Thorac Surg*, 79: 888-896.

Kim K.M., Valigorsky J.M., Mergner W.J., Jones R.T. et al. (1976): Aging changes in the human aortic valve in relation to dystrophic calcification. *Hum Pathol*, 7: 47-60.

Knight R.L., Booth C., Wilcox H.E., Fisher J., Ingham E. (2005): Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *Heart Valve Dis*, 14: 806-813.

Knight R.L., Wilcox H.E., Korossis S.A., Fisher J., Ingham E. (2008): The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng H*, 222: 129-143.

Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J. et al. (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 7: 430-436.

Kolf C.M., Cho E., Tuan R.S. (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research e Therapy*, 9: 204.

Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R. et al. (2001): Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105: 369-377.

Kuci S., Kuci Z., Latifi-Pupovci H., Niethammer D., Handgretinger R., Schumm M., Bruchelt G., Bader P., Klingebiel T. (2009): Adult stem cells as an alternative source of multipotential (pluripotential) cells in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*, 4: 107-117.

Kucia M., Dawn B., Hunt G., Guo Y., Wysoczynski M., Majka M., Ratajczak J. Rezzoug F., Ildstad S.T., Bolli R., Ratajczak M.Z. (2004): *Circulation Research*, 95: 1191-1199.

Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. (2005): Bone marrow as a source of circulating CXCR4 tissue-committed stem cells. *Biology of the Cell*, 97: 133-146.

Kuo Y.R., Goto S., Shih H.S. et al. (2009): Mesenchymal stem cells prolong composite tissue allotransplant survival in a swine model. *Transplantation*, 87: 1769-1777.

Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H. et al. (2003): Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol*, 74: 833-845.

Kuznetsov S.A., Mankani M.H., Gronthos S. et al. (2001): Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 153: 1133-1140.

Langer R., Vacanti J.P. (1993): Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926.

Le Blanc K., Ringden O. (2005): Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11: 321-334.

Leri A., Kajstura J., Anversa P. (2005): Identity deception: not a crime for a stem cell. *Physiology*, 20: 162-168.

Ling F., Fang W., Chen Y., Li J., Liu X., Wang L., Zhang H., Chen S., Mei Y., Du H., Wang C. (2010): Identification of novel transcripts from the porcine MYL1 gene and initial characterization of its promoters. *Mol Cell Biochem*, 343: 239-247.

Liu J., Hu Q., Wang Z., Xu C., Wang X. et al. (2004): Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H501-H511.

Loges S., Fehse B., Brockmann M.A. et al. (2004): Identification of the adult human hemangioblast. *STEM CELLS DEV*, 13: 229-242.

Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al. (1999): Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103: 697-705.

Mangi A.A., Noiseux N., Kong D., He H., Rezvani M., Ingwall J.S., Dzau V.J. (2003): Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 9: 1195-1201.

Mann D.L., Bristow M.R. (2005): Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation*, 111: 2837-2849.

Martin G.R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 7634-7638.

Matsubara H. (2004): Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet*, 363:746-747.

Matsuda T., Nakamura T., Nakao K. et al. (1999): STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*, 18: 4261-4269.

Maximow A.A. (1928): Culture of blood leucocytes: from lymphocyte and monocyte to connective tissue. *Arch Exp Zellforsch*, 5: 169-268.

Min J.Y., Sullivan M.F., Yang Y., Zhang J.P., Converso K.L., Morgan J.P., Xiao Y.F. (2002): Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg*, 74: 1568-1575.

Morgan C.J., Pledger W.J. (1992): Fibroblast proliferation. In: Cohen I.K., Diegelmann R.F., Lindblad W.J. (eds). Wound healing: biochemical and clinical aspects. *WB Saunders, New York*, 63-76.

Moscoso I., Centeno A., Lopez E. et al. (2005): Differentiation “in vitro” of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc*, 37: 481-482.

Mueller S.M., Glowacki J. (2001): Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*, 82: 583-590.

Nauta A.J., Fibbe W.E. (2007): Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110: 3499-3506.

Neuenschwander S., Hoerstrup S.P. (2004): Heart valve tissue engineering. *Transpl Immunol*, 12: 359-365.

Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K. et al. (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95: 379-391.

Nishida S., Endo N., Yamagiwa H. et al. (1999): Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*, 17: 171-177.

Noort W.A., Sluiter J.P.G., Goumans M.J., Chamuleau S.A.J., Doevendans P.A. (2009): Stem cells from in- or outside of the heart: isolation, characterization, and potential for myocardial tissue regeneration. *Pediatr Cardiol*, 30: 699-709.

Norol F. et al. (2003): Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood*, 102: 4361-4368.

Olson L.J., Subramanian R., Edwards W.D. (1984): Surgical pathology of pure aortic insufficiency: a study of 225 cases. *Majo Clin Proc*, 59: 835-841.

Onishchenko N.A., Potapov I.V., Bashkina L.V., Krasheninnikov M.E., Zaidenov V.A., Avramov P.V. (2004): Recovery of contractile function of cryodamaged rat myocardium after transplantation of fetal cardiomyocytes and predifferentiation bone marrow stromal cells. *Bull Exp Biol Med*, 138: 357-360.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine S.M., Leri A., Anversa P. (2001 a): Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann NY Acad Sci*, 938: 221-229.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B. et al. (2001 b): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410: 701-705.

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. (2001 c): Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10344-10349.

Pennica D., Shaw K.J., Swanson T.A. et al. (1995): Cardiotrophin-1: biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem*, 270: 10915-10922.

Perez-Moreno M., Jamora C., Fuchs E. (2003): Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112: 535-548.

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147.

Pittenger M., Vanguri P., Simonetti D., Young R. (2002): Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskel Neuron Interact*, 2: 309-320.

Prelle K., Zink N., Wolf E. (2002): Pluripotent stem cells-model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol*, 31: 169-186.

Rafii S., Lyden D. (2003): Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 9: 702-712.

Ratajczak M.Z., Majka M., Kucia M., Drukala J., Pietrkowski Z., Peiper S., Janowska-Wieczorek A. (2003): Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *STEM CELLS*, 21: 363-371.

Ratajczak M., Kucia M., Majka M., Reza R., Ratajczak J. (2004 a): Heterogeneous populations of bone marrow stem cells-are we spotting on the same cells from the different angles?. *Folia Histochem Cytobiol*, 42: 139-146.

Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R., Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J. (2004 b): Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*, 18: 29-40.

Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Wysoczynski M., Wan W., Ratajczak J., Wojakowski W., Kucia M. (2008): Hunt for pluripotent stem cell-regenerative medicine search for almighty cell. *Journal of Autoimmunity*, 30: 151-162.

Rieder E., Kasimir M.T., Silderhumer G., Seebacher G., Wolner E., Simon P. et al. (2004): Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127: 399-405.

Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W., Stevens C.E. (1993): Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 81: 1679-1690.

Scacciatella P., Marra S. (2007): La terapia cellulare dell'infarto miocardico acuto con cellule staminali osteomidollari: dati acquisiti e problematiche aperte. *Bone marrow stem cells therapy for acute myocardial infarction: acquired data and opened issues. Cardiologia ambulatoriale*, 2-3: 76-82.

Schoen F.J., Levy R.J. (2005): Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*, 79: 1072-1088.

Seeburger J., Groesdonk H., Borger M.A., Merk D., Ender J., Falk V., Mohr F.W., Doll N. (2009): Quadruple valve replacement for acute endocarditis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 137: 1564-1565.

Seta N., Kuwana M. (2007): Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J Med*, 56: 41-47.

Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A., Senechal G., Meyers J., Redmond J.M., Pittenger M.F., Martin B.J. (2002): Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarcted model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, 73: 1919-1925.

Shintani S., Murohara T., Ikeda H. et al. (2001): Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103: 2776-2779.

Simon P., Kasimir M., Seebacher G., Weigel G., Ullrich R., Salzer-Muhar U. et al. (2003): Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg June*, 23: 1002-1006.

Solter D., Skreb N., Damjanov I. (1970): Extrauterine growth of mouse egg cylinders results in malignant teratoma. *Nature*, 227: 503-504.

Spina M., Ortolani F., El Messlemani A., Gandaglia A., Bujan J., Garcia-Honduvilla N. et al. (2003): Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprostheses: extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features. *J Biomed Mater Res A*, 67: 1338-1350.

Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. (2001): Stem cells find their niche. *Nature*, 414: 98-104.

Stahl N., Farruggella T.J., Boulton T.G. et al. (1995): Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, 267: 1349-1353.

Stein D., Kloster F.E. (1977): Valvular heart disease in osteogenesis imperfecta. *Am Heart J*, 94: 637-641.

Stenderup K., Justuesen J., Clausen C. et al. (2003): Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33: 919-926.

Strauer B.E., Brehm M., Zeus T. et al. (2002): Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 106: 1913-1918.

Suh H. (2000): Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine. *Yonsei Med J*, 41: 681-684.

Surani M.A., Hayashi K., Hajkova P. (2007): Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, 128: 747-762.

Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W. (2002): Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-545.

Terada S., Sato M., Sevy A., Vacanti J.P. (2000): Tissue engineering in the twenty-first century. *Yonsei Med J*, 41: 685-691.

Thom T., Haase N., Rosamond W. et al. (2006): Heart disease and stroke statistics—2006 update. A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 113: e85-e151.

Tomita S., Ishida M., Nakatani T., Fukuhara S., Hisashi Y., Ohtsu Y., Suga Yutani C., Yagihara T., Yamada K., Kitimura S. (2004): Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *J Heart Lung Transplant*, 23: 577-584.

Tondreau T., Meuleman N., Delforge A. et al. (2005): Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *STEM CELLS*, 23: 1105-1112.

Vesely I. (2005): Heart valve tissue engineering. *Circ Res*, 97: 743-755.

Vincentelli A., Wautot F., Juthier F. et al. (2007): In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? *J Thorac Cardiovasc Surg*, 134: 424-432.

Vulliet P.R., Greeley M., Halloran S.M., MacDonald K.A., Kittleson M.D. (2004): Intra-coronary arterial injection of the mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*, 363: 783-784.

Waller B.F., Zoltick J.M., Rosen J.H. et al. (1982): Severe aortic regurgitation from systemic hypertension (without aortic dissection) requiring aortic valve replacement: analysis of four patients. *Am J Cardiol*, 49: 473-477.

Wan C., He Q., Li G. (2006): Allogenic peripheral blood derived mesenchymal stem cells (MSCs) enhance bone regeneration in rabbit ulna critical sized bone defect model. *J Orthop Res*, 24: 610-618.

Wang X., Moutsoglou D. (2009): Osteogenic and adipogenic differentiation potential of an immortalized fibroblast-like cell line derived from porcine peripheral blood. *In vitro Cell Dev Biol-Animal*.

Wilcox H.E., Korossis S.A., Booth C., Watterson K.G., Kearney J.N., Fisher J. et al. (2005): Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis*, 14: 228-236.

Williams R.L., Hilton D.J., Pease S. et al. (1988): Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336: 684-687.

Wollert K.C., Drexler H. (2005): Clinical application of stem cells for the heart. *Circ Res*, 96: 151-163.

Wu G.D., Nolte J.A., Jin Y.S. et al. (2003): Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation*, 75: 679-685.

Wurmser A.E., Nakashima K., Summers R.G., Toni N., D'Amour K.A., Lie D.C., Gage F.H. (2004): Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature*, 430: 350-356.

Xiang Z., Liao R., Kelly M.S., Spector M. (2006): Collagen-GAG scaffolds grafted onto myocardial infarcts in a rat model: a delivery vehicle for mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*, 12: 2467-2478.

Yacoub M.H., Takkenberg J.J. (2005): Will heart valve tissue engineering change the world? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2: 60-61.

Yoon Y.S., Lee N., Scadova H. (2005): Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol Cell*, 97: 253-263.

Yu Y., Li K., Bao C., Liu T., Jin Y., Ren H. et al. (2009): Ex vitro expansion of human placenta-derived mesenchymal stem cells in stirred bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159: 110-118.

Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., Littman D.R. (1998): Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393: 595-599.

Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. et al. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13: 4279-4295.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dott.ssa Rosa Di Liddo, per avermi dato la possibilità di avvicinarmi al mondo della ricerca nel momento in cui ciò non sembrava possibile, e di iniziare questo cammino che per me è stato un percorso formativo importante e prezioso che mi ha arricchito molto. La ringrazio per i suoi consigli, per avermi insegnato con passione e pazientemente la citometria, per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto e per l'aiuto nel risolvere i problemi pratici che si presentavano, compresa la stesura di questo lavoro.

Ringrazio il Professor Pier Paolo Parnigotto e la Professoressa Maria Teresa Conconi, per avermi permesso di svolgere questo bellissimo lavoro e per la gentilezza avuta nei miei confronti in questi tre anni.

Ringrazio il Professor Gino Gerosa e il Dott. Alessandro Gandaglia, per la disponibilità dimostrata e la collaborazione alla preparazione di matrici acellulari.

Ringrazio Silvia Barbon, Annachiara Martinelli, Eleonora Schittullo, per l'aiuto che mi hanno dato collaborando e partecipando attivamente agli esperimenti in questo progetto di ricerca.

Ringrazio i miei compagni di laboratorio, Marco, Piergiorgio, Valentina, Silvia, Deborah, Rosa, con i quali ho avuto il piacere e la fortuna di condividere questo periodo importante della mia vita. Voglio ringraziarli per i tanti momenti allegri e per i sorrisi che hanno arricchito e reso piacevoli le nostre giornate nel laboratorio di Trecenta. Un ringraziamento particolare a Marco Venturini, per la disponibilità dimostrata aiutandomi negli studi di western blotting.

Ringrazio la mia famiglia, per essermi stata accanto nei momenti belli e in quelli più duri di questi anni, per il sostegno in questo percorso impegnativo e difficile ma che mi ha donato tanto, permettendomi di imparare e capire tante cose, e che sicuramente sarà importante e potrà aiutarmi per il mio futuro.