

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE SPECIALISTICHE

Progetto n°1: Fisiopatologia dell'Insufficienza Cardiaca

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D1

Settore Scientifico disciplinare: MED/11

***UN ESTERE MISTO DEGLI ACIDI IALURONICO,
BUTIRRICO E RETINOICO É IN GRADO DI AGIRE
COME RIMODELLANTE INVERSO DELLA MATRICE
CELLULARE SUI FIROBLASTI CARDIACI***

Presentata da: Dottoressa Claudia Cavallini

Coordinatore Dottorato:

Relatore:

Chiar.mo Professor Angelo Branzi

Chiar.mo Professor Carlo Ventura

Esame finale anno 2013

Indice

<u>1 - Introduzione</u>	pag 4
1.1 – Fibrosi cardiaca.....	pag 4
1.2. – Cosa sono i fibroblasti?.....	pag 4
1.3 – Origine dei fibroblasti durante lo sviluppo embrionale.....	pag 5
1.4 – Funzione pleiotropica dei fibroblasti cardiaci.....	pag 7
1.5- - Miofibroblasti.....	pag 9
1.6 – I fibroblasti cardiaci nella cardiopatia.....	pag 12
1.7 – Fibrosi, miofibroblasti e fibroblasti.....	pag 14
1.8 – HBR.....	pag 15
1.9 – HBR e cellule staminali.....	pag 16
1.10 – HBR come farmaco.....	pag 18
1.11 – Inibizione delle HDAC.....	pag 22
<u>2 - Scopo della tesi</u>	pag 25
<u>3 - Materiali e metodi</u>	pag 27
3.1 – Piano sperimentale.....	pag 27
3.2 – Isolamento dei fibroblasti cardiaci neonatali.....	pag 27
3.3 – HBR.....	pag 28
3.4 – Saggi di crescita e vitalità cellulare.....	pag 29
3.5 – Valutazione del quantitativo di collagene.....	pag 30
3.6 – Zimografia.....	pag 30

3.7 – ELISA.....	pag 31
3.8 – Real Time PCR.....	pag 32
3.9 – Saggio di attività delle HDAC.....	pag 33
3.10 – Western Blot.....	pag 33
3.11 – immunofluorescenza.....	pag 34
3.12 – Saggio di migrazione.....	pag 34
<u>4 - Risultati</u>	pag 35
4.1 – Isolamento dei fibroblasti cardiaci.....	pag 35
4.2 - Crescita cellulare.....	pag 36
4.3 – Analisi di immunofluorescenza di cellule trattate e non trattate con HBR.....	pag 37
4.4 – Espressione genica.....	pag 39
4.5 – Deposizione dell’ECM.....	pag 41
4.6 – Migrazione.....	pag 42
4.7 –ELISA.....	pag 45
4.8 – Western Blot.....	pag 46
4.8 – Inibizione delle HDAC.....	pag 47
<u>5 - Discussione</u>	pag 48
<u>6 - Bibliografia</u>	pag 53

1 – Introduzione

1.1 - Fibrosi cardiaca

La fibrosi cardiaca è un processo la cui causa e il cui effetto sono uno sbilanciamento tra deposizione della matrice extracellulare (ECM – extracellular matrix) e la degradazione della stessa; la maggioranza delle malattie cardiache è associata ad essa. In generale è un processo di cicatrizzazione caratterizzato da un accumulo di fibroblasti e dall'eccessiva deposizione di proteine della matrice extracellulare che altera l'architettura e la funzionalità dell'organo (Weber K.T. 1997). L'insorgenza della fibrosi, quindi, compromette la funzionalità cardiaca, determinando un ridotto rilassamento diastolico (stiffness) e inducendo una cascata di segnale patologica all'interno dei cardiomiociti, risultando nello scompenso cardiaco (de Bakker et al, 1996). I fibroblasti sono i principali responsabili della deposizione dell'eccessivo ECM fibrotico e, in particolare, i fibroblasti una volta attivati possono causare direttamente l'ipertrofia dei cardiomiociti attraverso meccanismi paracrini che contribuiscono ulteriormente a scompensare il cuore (Gray et al 1998).

I fibroblasti e i miofibroblasti sono i principali produttori di ECM e contribuiscono in modo significativo alla fibrosi cardiaca (Eghbali M, Weber KT, 1990).

1.2 - Cosa sono esattamente i fibroblasti?

I fibroblasti sono cellule di origine mesenchimale in grado di produrre una grande varietà di proteine della matrice e di mediatori biochimici, quali fattori di crescita e proteasi (Souders CA et al., 2009). Non esistono per questo tipo di cellule marcatori univoci, anche se esiste un set di marcatori comunemente trovati in esse. I fibroblasti sono identificabili attraverso caratteristiche morfologiche, proliferative e fenotipiche. Morfologicamente, i fibroblasti sono di forma allungata, con molti processi cellulari che si originano dal corpo cellulare. Nel tessuto cardiaco, i fibroblasti sono l'unico tipo cellulare a non essere associato alla membrana basale.

Nonostante gli sforzi per evidenziare un profilo proteico caratteristico dei fibroblasti, non è stata identificata nessuna proteina marker esclusivamente espressa. Esistono però marcatori tessuto specifici, come ad esempio nel miocardio il “discoidin domain receptor 4” (DDR) e una proteina legante il calcio associata ai filamenti intermedi, chiamata “fibroblast specific protein 1 (FSP1). (Camellitri P. et al, 2005, Banerjee I et al., 2007).

Protein	Function	Expressed by other cell type	Refs.
α -Smooth muscle actin (α SMA)	Intermediate-filament associated protein	Smooth muscle cells, pericytes, myoepithelial cells	Akpolat et al. (2005); Azuma et al. (2009)
Cadherin-9	Ca-dependent adhesion molecule	Neurons; tumor vasculature	Thedieck et al. (2007); Hirano et al. (2003)
CD40	TNF α receptor family member	Various antigen presenting cells	Smith (2004)
CD248 (TEM1)	Collagen receptor	Pericytes, endothelial cells	Bagley et al. (2008); MacFadyen et al. (2005)
Coll1a1	Collagen type I biosynthesis	Osteoblasts, chondroblasts	Liska et al. (1994)
Discoidin domain receptor 2 (DDR2)	Collagen-binding tyrosine kinase receptor	Smooth muscle cells, hepatic stellate cells, endothelial cells	Vogel et al. (2006); Olaso et al. (2001); Mohan et al. (2001)
Fibroblast activation protein-1 (FAP1)	Serine protease (gelatinase)	Activated melanocytes	Rettig et al. (1993); Ramirez-Montagut et al. (2004)
Fibroblast-specific protein-1 (FSP1/S100A4)	Intermediate-filament associated Ca-binding protein	Smooth muscle cells, invasive carcinoma cells	Strutz et al. (1995); Sugimoto et al. (2006)
Fibroblast surface antigen (FSA)	Fibronectin-binding molecule	Monocytes/macrophages	Wartiovaara et al. (1974)
Heat shock protein-47 (HSP47)	Collagen-binding serpin chaperone	Monocytes/macrophages, various collagen-producing cells	Shioshita et al. (2000); Sauk et al. (2005)
Platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR β)	Receptor tyrosine kinase	Smooth muscle cells, pericytes	Lindahl et al. (1997); Kaur et al. (2009)
Prolyl-4-hydroxylase	Collagen biosynthesis	Endothelial cells, epithelial cells	Mussini et al. (1967); Langness and Udenfriend (1974)
Thymus cell antigen-1 (THY1/CD90)	Cell adhesion molecule	Leukocytes, endothelial cells, various progenitor cells	Wetzel et al. (2006); Dezsó et al. (2007)
Vimentin	Intermediate-filament associated protein	Endothelial cells, smooth muscle cells, pericytes, myoepithelial cells	Franke et al. (1979); Mork et al. (1990)

Ca, calcium; TEM, tumor endothelial marker; TNF, tumor necrosis factor.

Figura I-1. marcatori comuni nei fibroblasti

1.3 - Origine dei fibroblasti durante lo sviluppo embrionale

Anche se è generalmente accettato che la parte non miocitaria rappresenti la maggior parte della cellularità nel cuore, il numero di fibroblasti nel tessuto cardiaco rimane sconosciuto. Il cuore di un topo adulto contiene approssimativamente un 55% di cardiomiociti e solo un 45% di cellule non contrattili, di cui il 27% sono fibroblasti. Al contrario, il cuore di ratto adulto consiste del 30% di miociti e del 70% di non-miociti, di cui il 67% fibroblasti (Vliegen HW et al., 1991). Anche se non ci sono studi comparabili sull'uomo, questi dati mostrano come la composizione cellulare del cuore sia altamente variabile in relazione alla specie e come questa differenza di composizione sia in grado di variare fortemente la capacità di generare pressione, la composizione in collagene, la frequenza cardiaca e la conduttanza (Banerjee I et al., 2007).

Durante l'embriogenesi i fibroblasti cardiaci sembrano derivare da diverse fonti sia a livello spaziale che temporale. I fibroblasti dell'interstizio cardiaco e dell'anello fibroso sembrano avere origine mesenchimale nel pro-pericardio embrionale (Norris RA et al., 2008). Cellule di derivazione embrionale migrano sopra la superficie del cuore embrionale e formano l'epicardio dando origine a loro volta alle cellule derivate dall'epicardio (EPDC) (Lie-Venema H et al., 2007). Le EPDC incorrono nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e progressivamente differenziano in fibroblasti sotto l'influenza di fattori di crescita, come il "platelet derived growth factor (PDGF)", il "fibroblast growth factor (FGF)" e il "transforming growth factor (TGF)" (Olivey HE et al., 2006).

Diversamente dai fibroblasti interstiziali, quelli valvolari originano dall'endotelio cardiaco (de Lange FJ et al, 2004). Le cellule endoteliali presenti nelle regioni che formeranno i cuscinetti cardiaci vanno incontro alla transizione endotelio-mesenchimale (EndMT), sotto l'influenza di varie citochine come TGF e PDGF. In seguito, le cellule così trasformate invadono la gelatina cardiaca e maturano in fibroblasti (figura I-2)

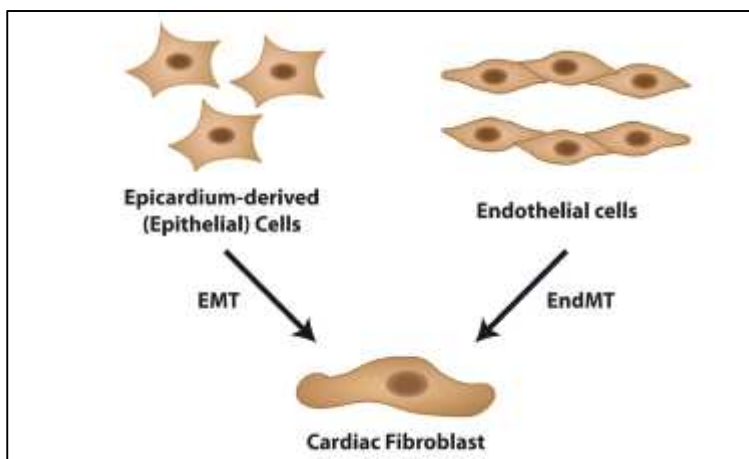


Figura I-2.: Origine embrionale dei fibroblasti cardiaci. Durante lo sviluppo embrionale, i fibroblasti cardiaci originano dalle cellule epiteliali del propericardio attraverso la transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Al contrario i fibroblasti valvolari derivano dall'endocardio attraverso la transizione endotelio-mesenchimale (EndMT).

1.4 - Funzione pleiotropica dei fibroblasti cardiaci

Anche se i fibroblasti cardiaci sono principalmente conosciuti per il loro ruolo di sintesi e di degradazione della ECM, essi non sono semplicemente produttori e degradatori di matrice. Infatti sono in grado di percepire i cambiamenti del microambiente e reagiscono a questi cambiamenti in modo da preservare la funzione dell'organo. I fibroblasti contribuiscono al mantenimento delle proprietà strutturali, meccaniche, biochimiche ed elettriche del cuore (figura I-3).

Omeostasi dell' ECM. I fibroblasti cardiaci presiedono alla regolazione di tutti quegli elementi coinvolti nel mantenimento dell'ECM, compresi il collagene interstiziale, i proteoglicani, le glicoproteine, le citochine e i fattori di crescita (Corda S et al., 2000). L'ECM ha varie funzioni, in particolare forma un network in grado di circondare e di interconnettere le cellule, fornendo uno scaffold a tutti i tipi cellulari presenti nell'organo; inoltre è in grado di distribuire le forze meccaniche attraverso il tessuto cardiaco e di convogliare i segnali meccanici alle singole cellule; in ultimo, tiene elettricamente separati atri e ventricoli, facilitando la corretta contrazione cardiaca. I fibroblasti cardiaci sono il fulcro dell'omeostasi dell'ECM, grazie alla loro abilità di secernere e degradare le proteine che formano la matrice. Infatti, in risposta a fattori di crescita (TGF; PDGF), a diverse citochine (TNF α , IL1 β) o a stimolazione meccanica, i fibroblasti producono collagene di tipo I e II, che insieme ricoprono circa il 90% del collagene nel cuore, così come molecole meno abbondanti, quali collagene di tipo IV, V, VI, elastina e laminina (Bosman FT et al., 2003). I fibroblasti regolano anche la degradazione dell'ECM, attraverso l'espressione di proteine in grado di digerire le molecole che compongono la matrice, ossia le metalloproteasi o MMP, e dei loro inibitori naturali, i "tissue inhibitor of MMP" o TIMP (Tsuruda T et al., 2004).

Produzione delle molecole bioreattive. Un'altra funzione dei fibroblasti cardiaci è quella di produrre e secernere fattori di crescita, ossia citochine e altre molecole di segnale. Queste molecole bioattive possono essere secrete in modo da poter agire per via paracrina ed autocrina, influenzando la proliferazione cellulare, la contrazione e l'apoptosi agendo non solo sui fibroblasti stessi, ma anche su tutte le altre cellule dell'organo (cardiomiociti, endoteliali, ecc).

Omeostasi dei vasi cardiaci. I fibroblasti cardiaci contribuiscono all'omeostasi dei vasi. L'angiogenesi, ossia la formazione di capillari da vasi sanguinei preesistenti, dipende dai segnali dell'ambiente circostante. L'interazione tra i fibroblasti e le cellule endoteliali durante lo sviluppo

dei vasi è stata largamente studiata, ma non completamente chiara. Sia FGF (fibroblast growth factor) che VEGF (vascular endothelial growth factor) sono potenti induttori dell'angiogenesi e sono entrambi prodotti e secreti dai fibroblasti (Chintalgattu V et al, 2003). Al contrario, l'espressione e la secrezione di "connetive growth factor (CTGF)" e PDGF ha un'azione anti angiogenetica (Inoki I et al., 2002). I fibroblasti possiedono, quindi, l'abilità di indurre o inibire la formazione di nuovi vasi sanguinei.

Elettrofisiologia cardiaca. I fibroblasti sono cellule non eccitabili, che si pensava non contribuissero alla elettrofisiologia cardiaca. La loro funzione è quella di formare un layer isolante di ECM, in grado di separare fisicamente i gruppi di miociti. Questo può essere osservato distintamente nell'anello fibroso, che separa elettricamente gli atri e i ventricoli, permettendo la contrazione in modo sequenziale. (Zhou B et al., 2010). La possibilità dei fibroblasti cardiaci di contribuire alla elettrofisiologia dell'organo è emersa solo recentemente. I fibroblasti hanno una alta resistenza di membrana, quindi con ottime caratteristiche di conduttanza per i segnali elettrici (Kohl P. 2003). Inoltre, i fibroblasti cardiaci sono accoppiati ai cardiomiociti attraverso la connessina 43 (CX43) e la connessina 45 (CX45) (Kohl P. 2003) e si hanno diverse evidenze *in vitro* di come questo accoppiamento di cardiomiociti e fibroblasti possa favorire la trasduzione del segnale elettrico (Miragoli M et al., 2006). L'ipotesi suggerita da questi dati è che i fibroblasti possano avere una funzione di ponte tra quei gruppi di cardiomiociti che normalmente sono separati elettricamente dall'ECM. Inoltre, l'interconnettività tra i cardiomiociti e i fibroblasti può provvedere a sincronizzare l'attività spontanea di cardiomiociti distanti (Rohr S. 2004). La rilevanza *in vivo* di questo possibile accoppiamento elettrico non è ancora stata dimostrata e necessita di ulteriori delucidazioni. Un ulteriore contributo dei fibroblasti cardiaci all' elettrofisiologia cardiaca può derivare dalla loro capacità meccanicocettiva. I fibroblasti difatti esprimono canali ionici attivati dallo stiramento, "stretch-activated ion channels", permeabili a Na^+ , K^+ e Ca^+ (Li GR et al. 2009). In risposta allo stress meccanico dovuto all'attività contrattile del miocardio circostante, questi canali si aprono e abbassano il potenziale di membrana del fibroblasto (Kamkin A et al., 2003). La rilevanza fisiologica di questa trasduzione necessita di ulteriori studi.

In conclusione, i fibroblasti cardiaci sono cellule multifunzionali che determinano sia lo sviluppo che il funzionamento dell'organo. I fibroblasti cardiaci non solo provvedono lo scaffold per tutti i tipi cellulari dell'organo, ma sono gli orchestratori della crescita dei cardiomiociti e della

formazione dei nuovi vasi. Inoltre sono coinvolti nella elettrofisiologia cardiaca, permettendo una corretta contrazione dell'organo.

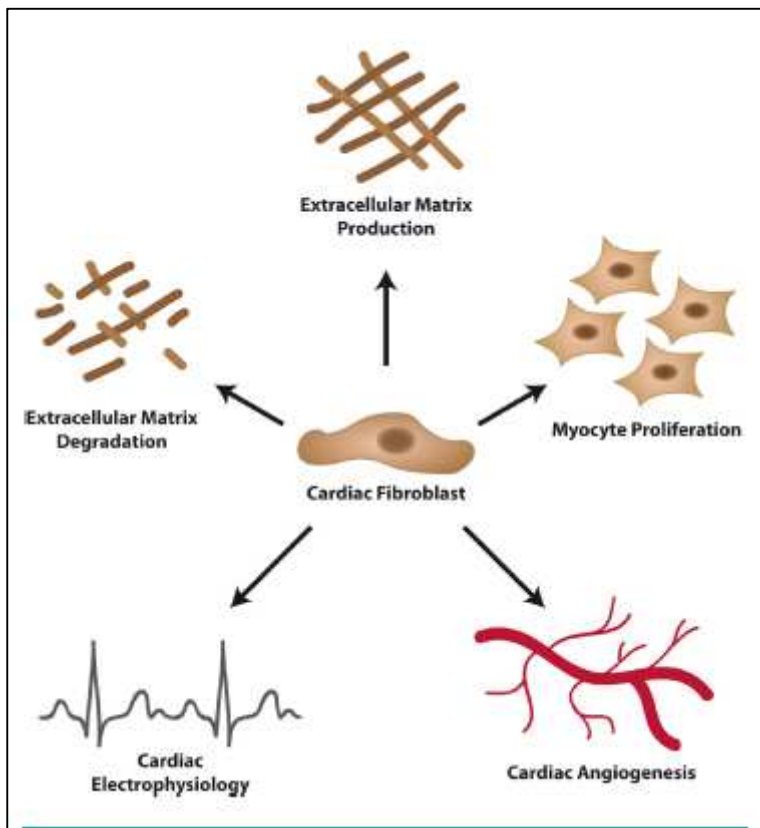


Figura I-3. Funzione pleiotropica dei fibroblasti cardiaci

1.5 - Miofibroblasti

Quando un tessuto va incontro a un danno, i fibroblasti differenziano in miofibroblasti, cellule con un profilo secretorio e contrattile diverso rispetto ai fibroblasti di origine. In condizioni fisiologiche, i fibroblasti presentano poche proteine associate all'actina in grado di fornire e supportare i contatti cellula-cellula o cellula-matrice, così come una produzione basale di ECM. Quando si verifica un danno, i fibroblasti si attivano, migrano nella sede dell'insulto e iniziano a sintetizzare ECM. L'origine dei miofibroblasti rimane ancora parzialmente sconosciuta. Difatti, se è probabile che la maggioranza di questi derivi dall'attivazione dei fibroblasti residenti, l'eterogeneità fenotipica tra la popolazione dei miofibroblasti suggerisce possibili diverse derivazioni di questa popolazione cellulare (figura I-4). Difatti alla popolazione di miofibroblasti che si trovano nel

tessuto danneggiato, contribuiscono non solo i fibroblasti residenti, che comunque danno origine alla maggior parte della popolazione, ma anche altri tipi cellulari di origine mesenchimale che giungono da diverse fonti. In particolare, sono in grado di trasformarsi in miofibroblasti, i periciti, le cellule muscolari lisce (smooth muscle cells, SMC), ed anche cellule mesenchimali derivate dal midollo (Bone Marrow derived circulating cells) conosciute come fibrociti e cellule epiteliali, attraverso un fenomeno noto come transizione epitelio-mesenchimale (EMT – epithelial to mesenchymal transition).

La distinzione tra fibroblasti e miofibroblasti è comunemente basata sull' espressione delle proteine contrattili. È importante notare che sia i fibroblasti che i miofibroblasti sono cellule mobili, contengono entrambi actine e miosine, anche se in quantità diverse. L'espressione delle diverse proteine dipende dal microambiente in cui le cellule si vengono a trovare, ossia dalle citochine presenti nel milieu, da parametri meccanici.

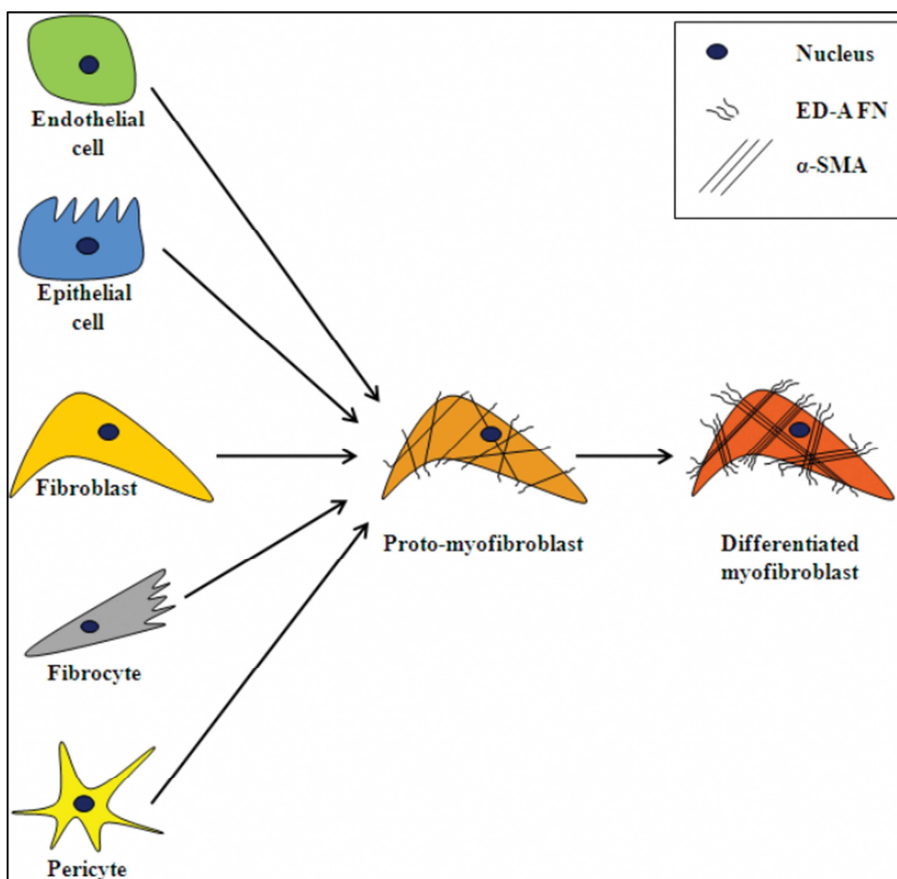


Figura I-4. Origine dei miofibroblasti

Il differenziamento dei fibroblasti in miofibroblasti è un processo che avviene in due fasi. In un primo momento i fibroblasti assumono capacità migratorie che consentono loro di colonizzare

l'area danneggiata, grazie all'espressione di nuove proteine contrattili, in particolare actine citoplasmatiche che generano forze di trazione di scarsa entità (Hinz B et al., 2001b). Queste cellule possono essere chiamate "proto-fibroblasti", per distinguerle dai fibroblasti quiescenti. Questo primo cambiamento fenotipico avviene in risposta a cambiamenti nella composizione, nella organizzazione e nelle proprietà meccaniche della matrice extracellulare (Hinz B et al., 2003b), nonché ad una reazione alle citochine rilasciate dalle cellule infiammatorie e residenti (Werner S, Grose R, 2003). In un secondo momento, poiché lo stress meccanico ed infiammatorio applicato all'ECM tende ad aumentare, i protomiofibroblasti evolvono verso miofibroblasti, caratterizzati dall'espressione di α -actina sarcomerica (α -SMA), il marker miofibroblastico per eccellenza. L'incorporazione di α -SMA nelle fibre di stress aumenta sensibilmente la capacità contrattile delle cellule fibroblastiche e caratterizza la fase contrattile del rimodellamento tissutale (Hinz B. et al., 2001a) (figura I-5).

Nel rimodellamento fisiologico, come nel caso di ferite cutanee, l'attività contrattile dei miofibroblasti termina quando il tessuto è riparato; l'espressione di α -SMA decresce e i miofibroblasti vanno incontro ad apoptosi (Desmouliere A, et al.. 2004). Normalmente questo fenomeno non regredisce solo ed esclusivamente se intervengono condizioni patologiche, come ad esempio nei malati di sclerodermia, di fibrosi polmonare, ecc. Nel cuore infartuato, invece, la persistenza dei miofibroblasti è la regola, poiché questa popolazione non regredisce né va incontro ad apoptosi continuando ad esprimere proteine contrattili e a depositare ECM in abbondanza.

In definitiva, i fibroblasti ed i miofibroblasti cardiaci sono cellule intersperse in un network di collagene e la differente espressione delle proteine contrattili osservate tra i fibroblasti e i miofibroblasti rappresentano un pleiomorfismo continuo, dovuto agli stimoli derivanti dall'ambiente circostante.

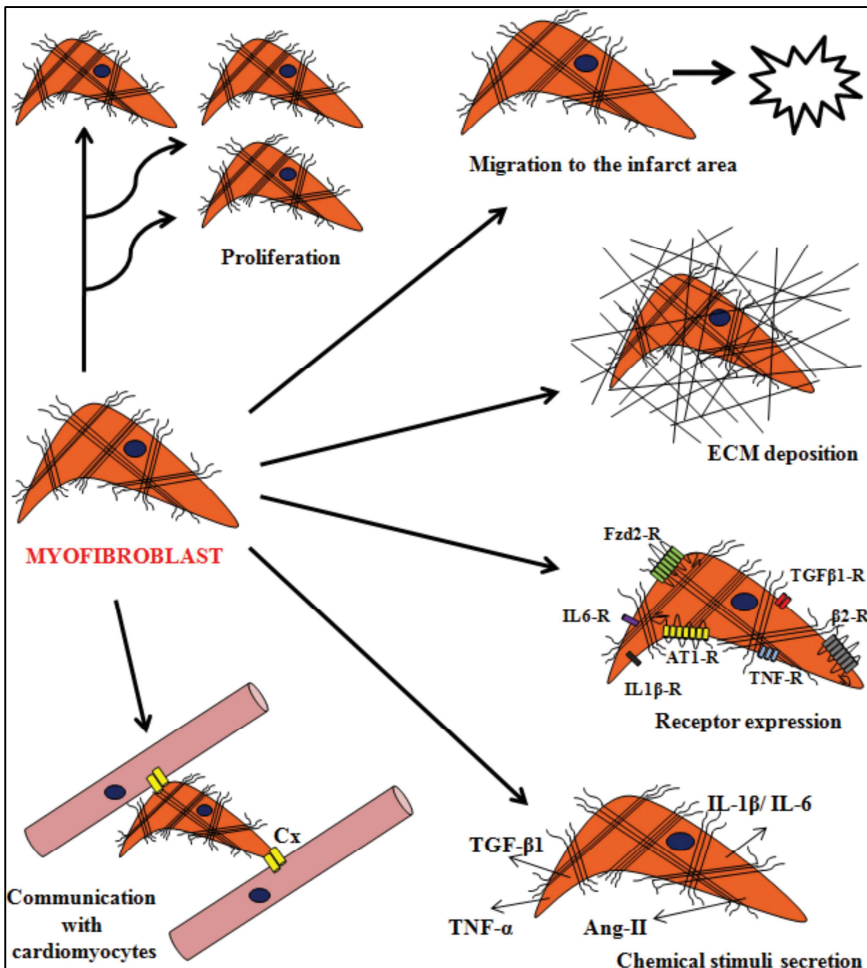


Figure I-5. Funzione dei fibroblasti differenziati.

1.6 - I fibroblasti cardiaci nella cardiopatia

In generale, nel cuore la deposizione e la degradazione di collagene sono bilanciate. Durante la cardiopatia, invece, la deposizione di collagene è fortemente aumentata in risposta al danno, sfociando in una distorta architettura e funzione dell'organo. Normalmente, in tutti gli organi, durante la cicatrizzazione, i fibroblasti, dopo aver deposto collagene, vanno incontro ad apoptosi, lasciando una cicatrice matura composta da collagene crosslinkato e da altri componenti di matrice. Nel cuore, questo meccanismo di regolazione non è rispettato, e, durante la cardiomiopatia, i fibroblasti non vanno mai incontro ad apoptosi, continuando a produrre collagene in maniera persistente portando rapidamente allo scompenso cardiaco.

La fibrosi del tessuto cardiaco ha conseguenze significative sulla funzionalità dell'organo. L'aumentata sintesi di ECM e la diminuita degradazione della matrice, risultano in un aumentato ispessimento della parete e disfunzione diastolica (Chaturvedi et al., 2010). Questa aumentata deposizione di ECM tra i cardiomiociti può interrompere l'accoppiamento elettrico e portare a scompenso (Spach MS, Boineau JP. 1997.). Inoltre l'infiammazione e la fibrosi perivascolare possono diminuire l'afflusso di ossigeno e di nutrienti aumentando il rimodellamento patologico in risposta a questo stress (Kai H. et al 2006.).

Come già menzionato, la fibrosi può avere due diverse origini:

1. Fibrosi di rimpiazzo o "replacement fibrosis", associata alla perdita di cardiomiociti. I fibroblasti occupano le aree lasciate libere dalle altre cellule
2. Fibrosi reattiva interstiziale "reactive interstitial fibrosis", che si origina nelle aree circondanti la microvascolatura e si estende attraverso tutto il miocardio

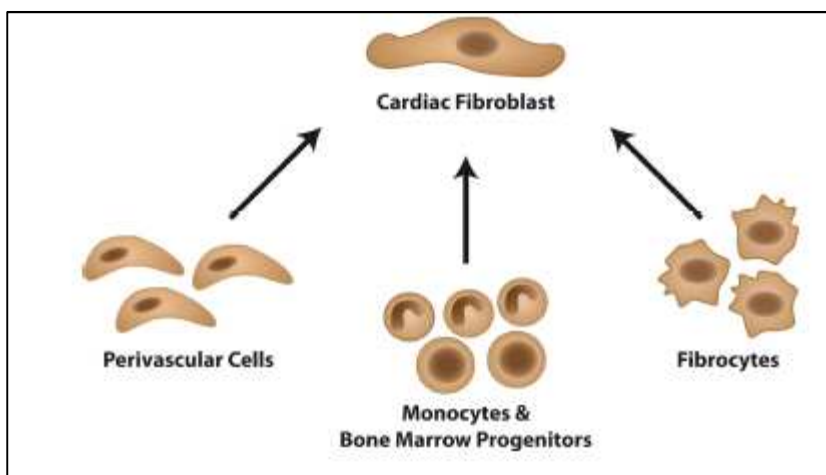


Figura 1-. origini alternative dei fibroblasti durante cardiopatia

Dal momento che entrambi i tipi di fibrosi originano da distinti distretti cardiaci, è probabile che i fibroblasti coinvolti in queste due diverse forme siano di diverse origini.

1.7 - Fibrosi, miofibroblasti e fibroblasti

A causa della sua natura dinamica, la composizione e la morfologia del collagene cardiaco può essere modificata in modo da adattarsi al danno cardiaco. La fibrosi di rimpiazzo nel periodo immediatamente successivo all'evento acuto è necessaria per la sopravvivenza dell'organo, ma ben presto avvengono cambiamenti maladattativi dell'ECM, che influiscono sul quantitativo e sul fenotipo del collagene, nonché sul grado di crosslinking dello stesso. La fibrosi cardiaca è caratterizzata da un' aumentata deposizione di collagene di tipo I, con un aumentato numero di legami, anche nelle aree lontane dal punto in cui si è verificato il danno iniziale (Cleutjens JP et al., 1999).

Un infarto guarito bene contiene una grande quantità di ECM, che occupa circa l' 80% dell'area infartuata. La deposizione di collagene avviene tuttavia anche nella zona lontana dall'infarto, in modo predominante nell'interstizio, dove contribuisce all'irrigidimento ventricolare e alla disfunzione. La fibrosi interstiziale del miocardio contribuisce direttamente al rimodellamento strutturale avverso in varie malattie cardiovascolari, come nella cardiomiopatia ipertrofica. Inoltre, oltre alle interazioni interstiziali nelle aree non infartuate, la fibrosi di rimpiazzo, che serve a supportare il ventricolo dopo l'infarto, nel tempo può contribuire ai cambiamenti geometrici e al deterioramento funzionale dell'organo.

Il cambiamento fenotipico dei fibroblasti e dei miofibroblasti è centrale nello sviluppo della fibrosi nei siti di rimodellamento dopo l'infarto. Alcuni fattori neuroumorali, come l'angiotensina II e il TGF β 1, sovraespressi dai cardiomiociti nelle aree adiacenti all'infarto, attraversano lo spazio interstiziale e fanno aumentare la produzione di collagene anche nelle aree distanti dall'infarto. La fibrosi che si sviluppa nelle regioni remote rappresenta la maggioranza del tessuto connettivo reperibile dopo una cardiomiopatia ischemica e contribuisce al rimodellamento strutturale avverso nel cuore scompensato (Beltrami CA et al.1994). In un cuore ben guarito ci deve essere un forte compromesso tra una cicatrice ricca di ECM di rimpiazzo ed una fibrosi remota minima .

La regolazione del sistema renina-angiotensina (RAS) contribuisce considerevolmente al remodeling ventricolare. La sovraespressione del recettore dell'angiotensina di tipo I, "AT1 receptor", nel miocardio è associata con la fibrosi interstiziale (Weber KT et al., 1997); topi che deficitano per il recettore AT1 mostrano difatti un rimodellamento strutturale minimo dopo

infarto (Harada K al., 1999). La somministrazione di farmaci in grado di bloccare i recettori dell'angiotensina durante l'infarto previene e/o riduce la morbilità e la mortalità dell'infarto stesso (Yusuf S et al, 2003). L'angiotensina II, prodotta nella sede del danno dai macrofagi, dai cardiomiociti e dai miofibroblasti, esercita il suo effetto stimolando direttamente la produzione di TGFβ1 (Sun Y. Et al., 2002). La sovraespressione di TGFβ1 fa aumentare la produzione da parte dei miofibroblasti cardiaci di collagene interstiziale, fibronectina e proteoglicani; la produzione di TGFβ1 da parte dei fibroblasti e dei miofibroblasti si automantiene attraverso un ciclo di secrezione autocrino, promuovendone il differenziamento e l'attivazione degli stessi (Wynn T.A., 2008). Le terapie farmacologiche basate sull'inibizione dell' "angiotensin converting enzyme" (ACE inibitori), o sul blocco del recettore dell'angiotensina, hanno effetti benefici sulla guarigione dopo l'infarto: difatti il trattamento contribuisce alla formazione di collagene nella zona infartuata, ma inibisce la deposizione di matrice nella zona remota (van den Borne SW et al, 2008).

Risulta quindi evidente come la modulazione dell'attività dei fibroblasti e della loro forma attivata, i miofibroblasti, sia di estrema importanza ai fini terapeutici. L'individuazione di molecole in grado di reprimere l'attività di questa popolazione cellulare, senza però eliminarla totalmente, è di estremo interesse nell'ottica della riduzione dei danni provocati dalle cardiomiopatie.

1.8 – HBR

HBR (Hyaluronic Butiric Retinoic) è un glicocongiugato, formato da acido retinoico unito da legami idrossilici ai gruppi carbossilici degli acidi butirrico e retinoico; è, quindi, un copolimero random di tre distinte unità dimeriche ripetute, come illustrato in Figura I-7, in cui le x sono non sostituite, le y portano il gruppo butirrico (C₃H₇CO) e le z quello retinoico (C₁₉H₂₇CO).

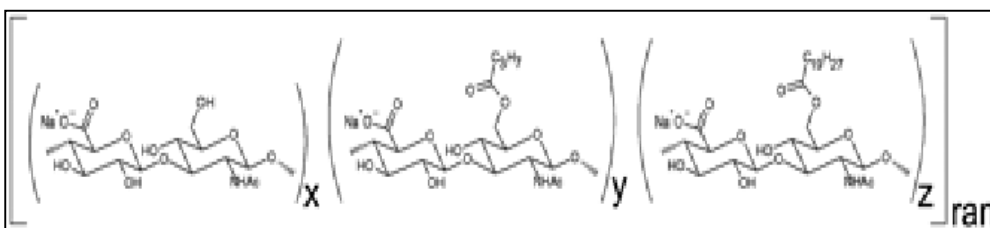


Figura I-7. HBR

Questa molecola è stata sintetizzata nel nostro laboratorio con un razionale ben preciso, ossia come agente differenziante di cellule staminali verso un fenotipo cardiaco. Difatti le tre componenti di questo estere hanno tutte un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale del cuore. Il recettore per lo ialuronato, CD44, è altamente espresso da cellule cardiogeniche, dai tubi endoteliali fusi e dall'epicardio vascolare che si trova attorno (Wheatley SC et al,1993). L'acido ialuronico (HA) può essere quindi traslocato all'interno della cellula per endocitosi recettore mediata, fornendo alla molecola la chiave per entrare nella cellula. Una volta all'interno della cellula, l'acido ialuronico viene traslocato nel nucleo dove si trova in stretta associazione all'eterocromatina nucleare (Tammi R et al., 2001) attraverso molecole capaci di legarlo (ialaderine), che hanno funzione di regolare splicing e ciclo cellulari. L'acido ialuronico funge da chiave, permette anche all'acido butirrico (BU), consentendogli di essere traslocato nella cellula. La sua azione è quella di inibire gli enzimi Istone Deacetilasi alterando la struttura della cromatina, andando ad aumentare l'accessibilità della cromatina ai fattori di trascrizione. L'acido retinoico (RA) è invece di massima importanza nello sviluppo del tessuto cardiaco. L'inattivazione del suo recettore RXR α nel topo causa morte embrionale e difetti alle camere ventricolari (Sucov H.M., et al., 1994). Inoltre è noto che cellule staminali trattate con acido all-trans retinoico (ATRA) abbiano un miglioramento nella resa cardiogenica (Wobus K. Et al., 1997). HBR, quindi, si configura come un composto multi-target, ossia pensato per colpire bersagli differenti, ma con una unica finalità farmacologica.

1.9 - HBR e cellule staminali

La perdita di cardiomiociti causata dall' infarto e dalle cardiomiopatie ereditarie rappresenta una delle cause della progressione dello scompenso cardiaco. Le cellule staminali sono state individuate come un'interessante opzione terapeutica, nell'ottica della rigenerazione miocardica. Sfortunatamente, la resa differenziativa delle cellule staminali in cardiomiociti è molto bassa e moltissimi sforzi sono stati fatti nel riuscire ad individuare trattamenti chimici capaci di aumentare la resa di questo processo. Studi effettuati su cellule embrionali di topo trattate con HBR hanno dimostrato come questa molecola sia efficace in tal senso (Ventura C et al, 2004), aumentando significativamente la resa in cardiomiociti delle staminali trattate. Si è poi testata la sua azione su

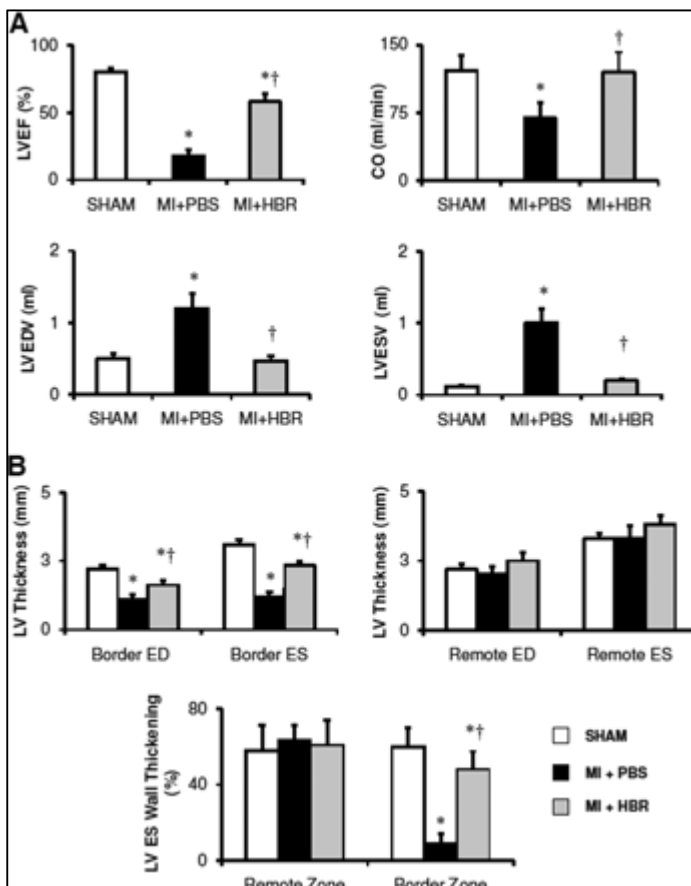
cellule mesenchimali staminali umane (hMSC), trattando le cellule *in vitro* per poi trapiantarle *in vivo* in animali (ratti) a cui era stato indotto infarto sperimentale. Le staminali mesenchimali trattate con HBR mostrano aumentata espressione di una serie di marker cardiaci ed endoteliali. In particolare HBR è in grado di far aumentare la trascrizione e la secrezione di citochine ad effetto trofico quali VEGF (vascular endothelial growth factor), fattore in grado di promuovere le vasculogenesi, e HGF (hepatocyte growth factor), fattore antiapoptotico e mitogeno. Anche KDR, recettore del VEGF, risulta sovraespresso nelle cellule trattate, probabilmente come effetto di un loop autocrino. HBR è in grado di agire sulla trascrizione di altri fattori legati al differenziamento, quali GATA-4 e Nkx2.5, geni promotori della cardiogenesi. Le cellule mesenchimali trattate per 15 giorni con HBR, trapiantate in cuori di ratto sottoposti ad infarto sperimentale, mostrano una capacità riparativa dell'organo significativamente superiore a quella di cellule mesenchimali staminali non trattate. In particolare negli animali che hanno ricevuto hMSC + HBR la funzionalità d'organo risulta migliorata, come evidenziato sia dalle analisi funzionali quali l'eco-cardiogramma sia dalle analisi immunohistochimiche effettuate dopo il sacrificio dell'animale. Le analisi istologiche hanno evidenziato infatti un'aumentata vascolarizzazione dell'organo con cellule umane positive a marker endoteliali e integrate nel tessuto. Al contrario, nessuna cellula di origine umana si è dimostrata capace di assumere un fenotipo cardiomiocitario maturo, pur essendo positive alla troponina cardiaca e alla connexina43 (marker cardiomiocitari specifici), ma non formando alcuna struttura ordinata e funzionale del citoplasma, né una vera e propria integrazione col tessuto ospite (Ventura C et al.,2007)

Questi dati hanno suggerito come HBR potesse svolgere una funzione di “potenziatore” delle caratteristiche specifiche di queste cellule, accelerando e incrementando un processo riparativo naturale. Questa idea ci ha portato a ipotizzare che l'effetto della molecola potesse essere sfruttato anche attraverso l'iniezione direttamente nei cuori infartuati senza l'ausilio di cellule staminali, di modo da “aiutare” i diversi tipi cellulari presenti nell'organo a superare i danni provocati dall' evento ischemico.

1.10 - HBR come farmaco

HBR è stato iniettato in cuori di ratti a cui era stato indotto infarto attraverso legatura permanente delle LAD, 2 ore dopo l'evento ischemico. Dopo 4 settimane sono stati valutati i parametri funzionali degli animali e, dopo sacrificio, è stata condotta l'analisi immunohistochimica sull'organo. Negli animali trattati con l'estere, sia la risonanza magnetica (Figura I-8) che la PET (Figura I-9) hanno mostrato un miglioramento significativo della performance cardiaca.

Figura I-8. Analisi funzionali della funzionalità del ventricolo sinistro. Funzionalità globale (A) e regionale (B) del ventricolo sinistro. I valori mostrati sono la media \pm S.E. di $n = 11$ animali, per ogni condizione sperimentale. LVEF, LV ejection fraction; CO, cardiac output; LVEDV, LV end diastolic volume; LVESV, LV end systolic volume; ED, end diastolic; ES, end systolic. Il gruppo trattato con HBR ha ricevuto $100 \mu\text{l}$ di HBR (0.2 mg di HBR/ 100 g peso animale). *, $p < 0.05$ vs SHAM; †, $p < 0.05$ vs MI + PBS (ANOVA con correzione di Bonferroni).



Nei cuori trattati con HBR l'analisi immunoistochimica ha messo in evidenza una aumentata densità capillare nella zona perinfartuale (figura I-5) e un incremento di cellule staminali stro1 positive. Inoltre l'area risulta meno fibrotica (Figura I-5, pannello A).

L'aumento di cellule staminali in questa zona può essere dovuto sia ad un ambiente più favorevole alla loro sopravvivenza, sia ad un loro maggior richiamo nella zona del danno. Difatti, esperimenti condotti in vitro sia su cardiomiociti di ratto, sia su cellule endoteliali che su cellule mesenchimali, hanno dimostrato come HBR sia in grado di indurre l'espressione genica e la secrezione di fattori antifibrotici, antiapoptotici e angiogenetici (Figura I-11) Con l'analisi in Real time PCR, si è evidenziata la sovraespressione di VEGF, HGF e pim1, fattore antiapoptotico. L'aumento della sintesi di RNA, corrisponde a un aumentata secrezione proteica, come mostrano le analisi ELISA condotte sui surnatanti delle cellule trattate con la molecola(CDEF fig5). L'azione di HBR quindi risulta essere principalmente a livello trascrizionale, poiché attraverso la modulazione dell'espressione genica delle cellule è in grado di cambiarne il profili secretorio.

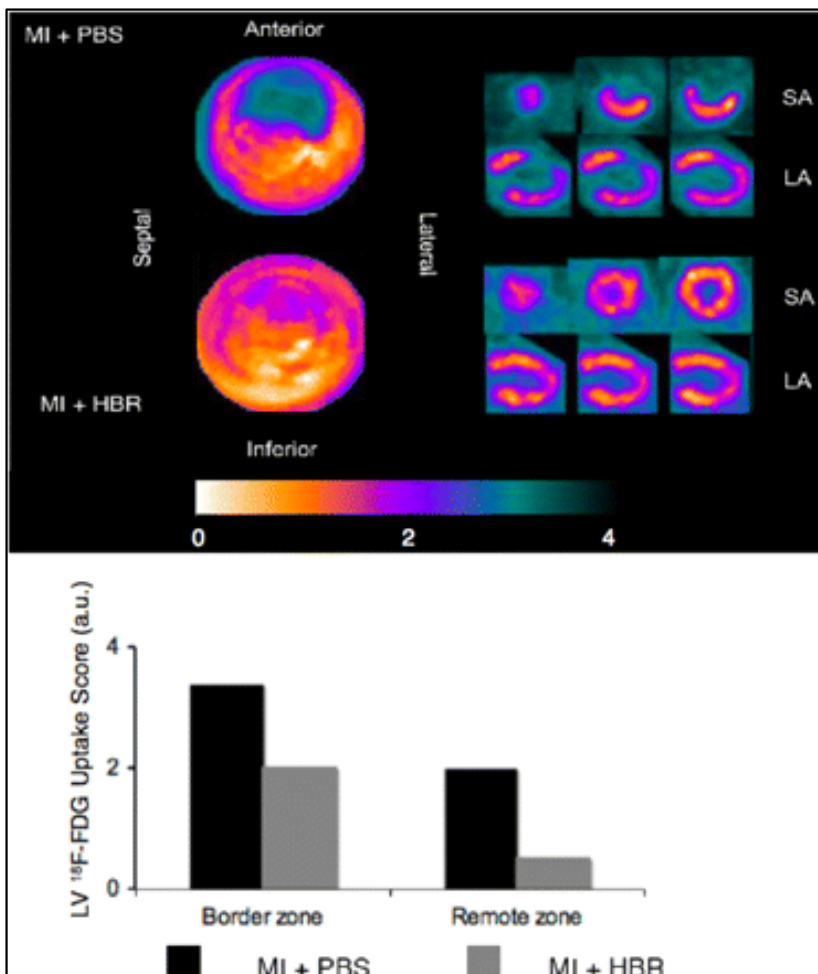


Figura I-9. Metabolismo del glucosio nel miocardio misurato con [18F]FDG. Sopra, immagini rappresentative fornite dalla PET. Sotto, valori medi dell'uptake di [18F]FDG da parte dei cuori infartuati trattati con 100 µl di HBR (0.2 mg di HBR/100 g di peso dell'animale) o con PBS. n = 11 animali per ogni condizione sperimentale. SA, short axis; LA, long axis. a.u., arbitrary units.

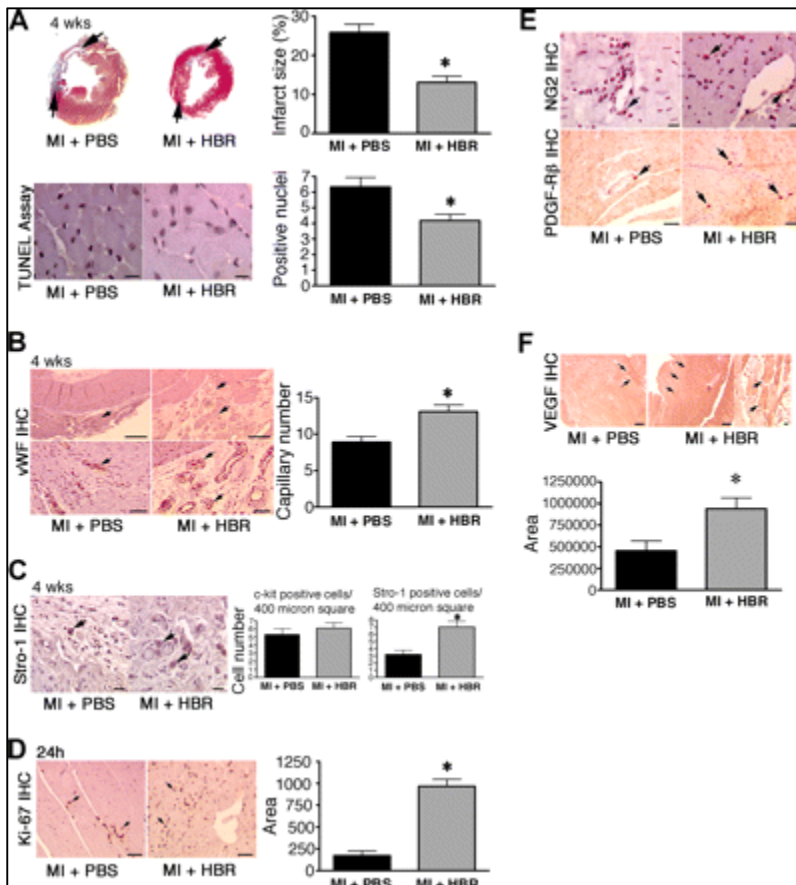


Figura I-10. A-C, 4 settimane dopo l'infarto miocardico. Miocardio ventricolare sinistro tagliato trasversalmente; il cuore di animali trattati con HBR (100 ml di soluzione HBR) mostra una cicatrice ridotta, rispetto agli animali trattati con PBS (A, immagini superiori, le frecce delimitano la zona infartuata). Colorazione Picro-Mallory: in blu la zona della cicatrice, in rosso il parenchima miocardio. Nella border zone di cuori trattati con HBR, la riduzione delle cicatrici è associata con un minor numero cardiomiociti apoptotici (A, immagini in basso, scale bar: 20 micron) e aumento del numero di capillari (B). L'espressione vWF mette in evidenza cellule endoteliali (frecce) che rivestono la parete capillare interna (B, scale bar: 300 micron (immagini superiori) e 50 micron (inferiori immagini)). C, in campioni trattati con HBR, cellule Stro-1 positive (frecce) sono aumentate in numero e sono strettamente associate con la parete capillare esterna, mentre le cellule c-Kit-positive non variano in modo significativo, rispetto agli animali non trattati. Scala, 20

μm . D-F, 24 h dopo infarto miocardico. D, il numero di cellule Ki-67 positive è significativamente aumentato negli animali trattati con HBR (frecche), scala, 50 micron; così come il numero di cellule che esprimono NG2 e PDGF-R β (frecche); scala, 30 micron (immagini superiori) e 100 micron (inferiori immagini) F, espressione di VEGF (frecche) scala: 100 micron (immagini sinistra e al centro) e 50 micron (immagine a destra) *, significativamente diversa da cuori trattati con PBS, $p < 0,05$ (test statistico t di Student).

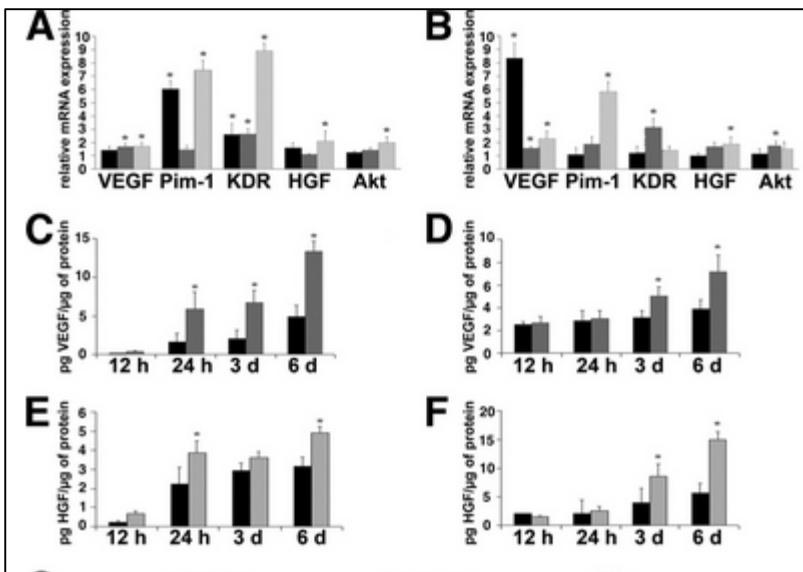


Figura I-11. A e B, l'espressione dei geni VEGF, KDR, HGF, AKT, e pim-1 è stata valutata mediante real-time PCR. Cardiomiociti di ratto (RCM) (A) o cellule STRO-1 (B) sono state coltivate per 24 h (barra nera), 3 giorni (grigio scuro), e 6 giorni (grigia chiaro) in assenza o presenza di HBR (2 mg / ml). L'abbondanza di ciascun mRNA in cellule non trattate è stata definita come 1, e le quantità mRNA di VEGF, KDR, HGF, AKT, e pim-1 nelle cellule trattate con HBR sono stati calcolati rispetto a tale valore (media \pm SE, $n = 6$). C-F, rilascio di VEGF e HGF liberati da RCM (C ed E) o cellule STRO-1 (D e F) coltivate in assenza (barra nera) o presenza (barra grigia) di HBR (media \pm SE, $n = 6$). *, Significativamente diverso da cellule non trattate (controlli), $p < 0.05$ (t test a due code, la Student)

1.11 - Inibizione delle HDAC

Come evidenziato precedentemente, il meccanismo d'azione dell' HBR passa quindi dal livello trascrizionale. Di particolare interesse a questo riguardo è la componente butirrica della molecola. Difatti l'acido butirrico è un inibitore delle iston deacetilasi e, una volta liberato dalle esterasi cellulari, può migrare nel nucleo e svolgere la sua attività.

Gli inibitori delle Iston Deacetilasi hanno in questi ultimi anni assunto un ruolo di grande rilievo nella cura delle cardiomiopatie che insorgono in seguito ad infarto miocardico acuto.

L'acetilazione/deacetilazione delle code N-terminali degli istoni è fattore cruciale di modulazione dell'espressione genica, poiché rendendo accessibile il genoma ai fattori di trascrizione. Difatti gli istoni sono le proteine che legano e condensano il DNA e che determinano lo stato di accessibilità di quest'ultimo alla trascrizione.

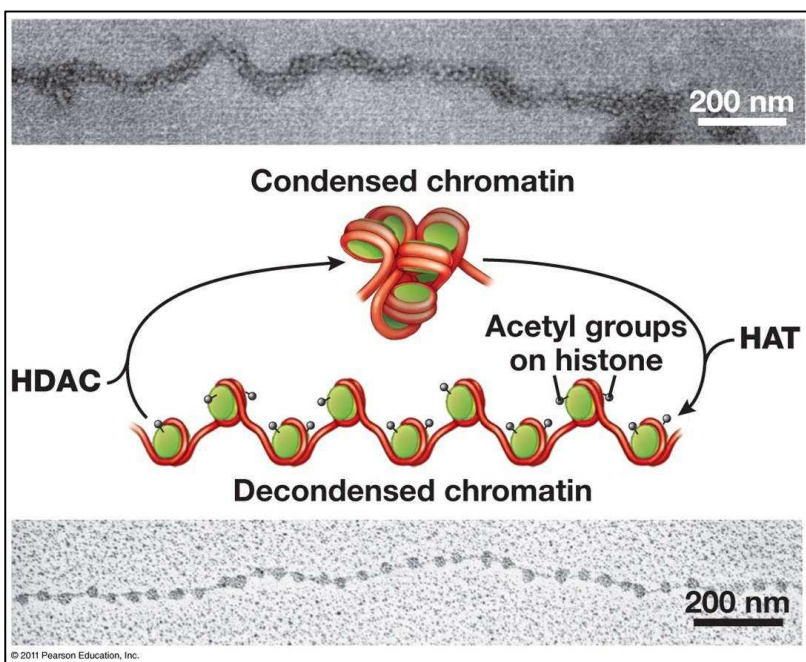


Figura I-12. processo di acetilazione e deacetilazione istonica

Il bilanciamento fra acetilazione e deacetilazione è determinato dall'attività di due classi di enzimi: le iston-acetil transferasi (HAT) e le Iston Deacetilasi (HDAC). Le HAT acetilano specifici residui di lisina presenti sugli istoni e di alcune proteine non istoniche. L'acetilazione istonica porta a un

cambiamento nella struttura della cromatina, diminuendo l'interazione istone-DNA, promuovendo l'accessibilità al DNA da parte delle proteine deputate alla trascrizione. L'acetilazione da parte delle HAT di proteine non istoniche quali alcuni fattori di trascrizione, regola ulteriormente il processo (Glozak M.A. et al 2005). Inoltre l'acetilazione /deacetilazione può avvenire a carico di numerose proteine citoplasmatiche, inclusa la tubulina, la heat shock protein 90 (hsp90), ed altre, alterandone la funzione (Catalano M.G. et al, et al 2007, Choudhary C. et al., 2009).

Gli enzimi con effetto opposto alle HAT nella regolazione dell'accessibilità del DNA da parte di fattori di trascrizione, sono le HDAC, ossia la famiglia di enzimi che rimuove i gruppi acetile dai residui di lisina, ristabilendo la carica netta positiva all'amminoacido deacetilato (Acharya M.R., et al, 2005). Più in generale le HDAC sono in grado di deacetilare i residui di lisina di diversi enzimi oltre agli istoni (Glozak M.A., 2005). Le HDAC sono classificate in quattro gruppi in base alla loro omologia alle iston deacetilasi di lievito: quelle di classe I (HDAC1, 2, 3 e 8) sono correlate al gene RPD3 collocate nel nucleo; quelle di classe II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 e 10) sono correlate al gene Hda1 di lievito e sono principalmente collocate nel citoplasma, con possibilità di essere traslocate nel nucleo; quelle di classe III (SIRT1-7) sono conosciute come Sirtuine, sono correlate al gene Sir2 di lievito e sono resistenti agli inibitori delle iston deacetilasi conosciuti; quelle di Classe IV (HDAC11) hanno un dominio conservato della regione catalitica tipico sia della Classe I che II. Ogni classe ha caratteristiche peculiari: ad esempio la classe I è coinvolta nella progressione del cancro, poiché regola la replicazione delle cellule cancerose (Fischle W., 2002). Le HDAC di classe I e II sono le classi meglio conosciute e quelle su cui gli inibitori delle iston deacetilasi in commercio agiscono meglio nell'ambito di terapie anti tumorali o di altre patologie correlate alla disregolazione dell'acetilazione istonica.

Studi recenti hanno messo in evidenza che le HDAC sono coinvolte nella fibrosi tissutale in molti organi come il fegato, il polmone e il cuore, aprendo nuove prospettive di utilizzo ai farmaci che agiscono sulle HDAC e sino ad ora correlati solo alla cura del cancro.

Il trattamento di cardiomiociti con inibitori delle HDAC, ad esempio, è stato in grado di prevenire l'ipertrofia causata da sovraccarico di pressione (Antos CL,2003). Numerosi inibitori delle HDAC sono stati identificati, come la tricostatina A (TSA), il sodio butirrato ed atri. Questi composti sono in grado di interagire direttamente con il sito catalitico delle HDAC e inibire quindi l'attività enzimatica (Finn, M doningian choen 1999 nature). L'inibizione dell'attività delle HDAC porta non ad una semplice attivazione generica della trascrizione, ma all'inibizione o alla sovraespressione di

geni specifici. Diverse evidenze sperimentali sembrano indicare un doppio ruolo delle HDAC, sia da attivatore che da soppressore dell'ipertrofia cardiaca. Sembra infatti che gli inibitori selettivi per le HDAC di classe I riescano a bloccare il progredire dell'ipertrofia, suggerendo che le HDAC di classe I abbiano un'attività profibrotica nei cardiomiociti (Kee H.J. et al 2006).

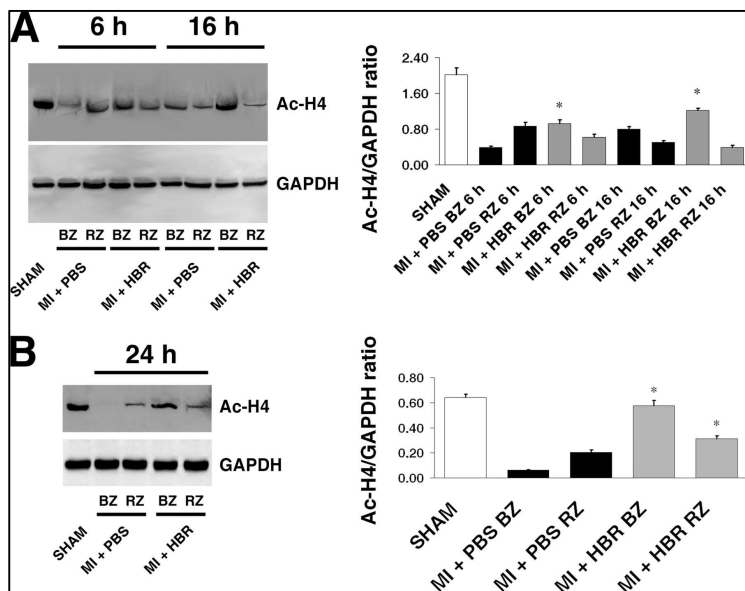


Figura I-13. Analisi Western blot di acetilazione dell'istone H4 eseguita in estratti tissutali totale dalla border zone (BZ) o dalla remote zone (RZ) di cuori infartuati (MI), 6 o 16 h (A) o 24 h (B) dopo iniezione in assenza (PBS) o presenza di HBR (0,2 mg di HBR/100 g di peso ratto). GAPDH è stato usato come controllo di caricamento. Il livello di acetilazione è stato stimato mediante quantificazione densitometrica (n = 3). *, Significativamente differenti dal punto stesso tempo il controllo all'interno della BZ MI (A) o da MI BZ MI RZ o (B). $p < 0.05$ (t di Student a due code).

È stato quindi studiato lo stato di acetilazione degli estratti tissutali di animali sottoposti a infarto sperimentale e trattati con HBR. L'analisi in Western Blot effettuata su estratti tissutali rivela che l'acetilazione dell'istone H4 decresce nelle zone infartuate, in cuori non trattati. Sei ore dopo l'iniezione di HBR, l'acetilazione dell'istone H4 aumenta nella zona perinfartuale, detta border zone, rispetto al controllo; alle 24h, lo stato di acetilazione risulta aumentato rispetto al controllo, sia nella border che nella zona lontana dall'infarto, detta remote zone. Si può quindi ipotizzare che l'effetto di HBR sia dovuto, almeno in parte, ad una inibizione dell'attività delle iston deacetilasi da parte della componente butirrica di HBR.

2 - Scopo della tesi

Lo scompenso cardiaco è un'importante causa di morbilità e mortalità dalle pesanti ricadute sul sistema sanitario nazionale; esso è il motivo di almeno il 20% di tutti i ricoveri tra le persone di età superiore a 65 anni. La percentuale complessiva di mortalità da scompenso è alta: il 20% dei pazienti muore entro il primo anno dopo la diagnosi ed il 50% muore entro 5 anni. Una delle principali cause dello scompenso è l'infarto miocardico, poiché gli eventi che avvengono a seguito dell'ischemia dell'organo e alla formazione della cicatrice hanno manifestazioni cliniche negative evidenti. Il ventricolo sinistro va incontro a un progressivo rimodellamento, causato dalla perdita di cardiomiociti e dalla proliferazione dei fibroblasti. I fibroblasti cardiaci sono la principale componente non contrattile del tessuto cardiaco e sono i principali responsabili della deposizione eccessiva di matrice extracellulare (ECM), che sfocia in una architettura dell'organo distorta e disfunzionale, dovuta a un irrigidimento della parete cardiaca con una conseguente perdita di funzionalità. Inoltre i fibroblasti attivati possono causare direttamente ipertrofia, attraverso la secrezione di fattori paracrini che vanno ad agire sui cardiomiociti. I fibroblasti non sono, infatti, dei semplici sintetizzatori e degradatori di matrice, ma reagiscono ai cambiamenti del microambiente cardiaco, come ad esempio lo stress meccanico o l'esposizione a fattori paracrini e autocrini, attivandosi e differenziando in cellule specializzate, chiamate miofibroblasti. Questi ultimi hanno un'aumentata capacità secretoria di proteine dell' ECM e sono dotati di proteine contrattili, per favorirne sia la migrazione che la capacità di cicatrizzazione. Sfortunatamente i miofibroblasti cardiaci non regrediscono con il consolidamento della cicatrice, continuando a sintetizzare e depositare proteine del collagene. Questo fenomeno porta rapidamente all'insorgere della fibrosi, sia di rimpiazzo che interstiziale, favorendo l'evoluzione verso lo scompenso cardiaco.

Recentemente abbiamo dimostrato che l'iniezione diretta di un estere misto degli acidi ialuronico, butirrico e retinoico (HBR) nel miocardio di ratti sottoposti a infarto sperimentale era in grado di migliorare la funzionalità dell'organo. Quattro settimane dopo l'iniezione di HBR, il cuore degli animali trattati mostra un generale miglioramento della performance cardiaca, associata a una diminuzione della fibrosi.

Si è dunque deciso di indagare in vitro quale sia l'effetto di questa molecola su questa popolazione cellulare, per determinare se essa sia in grado di arginare direttamente l'attività pro-fibrotica dei fibroblasti e dei miofibroblasti, giustificando i dati ottenuti in vivo sugli animali. In particolare si è studiato l'effetto di HBR in fibroblasti cardiaci di ratto su proliferazione e vitalità; capacità migratoria; espressione genica, sintesi e secrezione di protein legate sia alla deposizione della matrice extracellulare sia al progredire del differenziamento miofibroblastico. Si è inoltre cercato un possibile meccanismo di azione, analizzando le peculiarità della molecola. Scopo della tesi era capire se HBR potesse essere considerata una molecola con un'azione terapeutica diretta sui fibroblasti cardiaci.

3 - Materiali e Metodi

3.1 - Piano sperimentale

I fibroblasti cardiaci sono stati isolati da neonati di ratto Wistar attraverso digestione enzimatica e seminati in fiasche da 25 cm² (T25). Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate e seminate alla confluenza di 1000cells/cm², e su di esse sono stati condotti gli esperimenti, dopo averle private del siero per 24h (starvatura). Le cellule sono state trattate con dosi crescenti di HBR, a partire da 0g/l fino a 2g/l. Dopo 24h e per le successive 96h, la vitalità cellulare è stata valutata attraverso il dosaggio di LDH, il test MTT e il dosaggio dell'attività della caspasi 3, al fine di capire a quale dose HBR fosse in grado di bloccare il ciclo cellulare senza uccidere le cellule. Tutti gli esperimenti successivi sono stati condotti con HBR a una concentrazione compresa tra 0.5g/l (prima dose efficace) e HBR 1.5 g/l (dose più alta tollerata). Per valutare l'effetto di HBR sull'espressione genica, l'RNA, ottenuto da cellule controllo e trattate (HBR 0.5 g/l e 1.5g/l) per 24h, 48h, 96h e 5giorni, è stato estratto, retrotrascritto e quantificato tramite Real-Time PCR. Agli stessi intervalli di tempo sono state anche quantificate le proteine coinvolte nel turn-over dell' ECM. Inoltre sono stati analizzati anche dei marcatori specifici di questa popolazione cellulare per verificare eventuali cambiamenti nel fenotipo cellulare in seguito a trattamento con HBR. Si è valutata la capacità secretoria di queste molecole bioattive, per verificare se HBR fosse in grado di modificare la produzione di chemochine. Sono state inoltre valutate le capacità migratorie di queste cellule dopo un pretrattamento di 24h con HBR. Infine è stato indagato il meccanismo di azione, della molecola attraverso la valutazione dell'acetilazione istonica.

3.2 - Isolamento dei fibroblasti cardiaci neonatali

I fibroblasti cardiaci sono stati isolati da ratti Wistar neonati a 3-5 giorni dal parto. Dopo il sacrificio degli animali, i cuori sono stati prelevati, sminuzzati e lavati con HAM F-10, contenente K₂HPO₄, (83 mg/l), Na₂HPO₄ x 2H₂O (78.8 mg/l), inositolo (0.541 g/l), NaHCO₃ (1.2 g/l). Il tessuto è stato digerito a 37° C in un medium contenente Collagenasi di tipo IA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 10 mg/ml, 10% Tripsina (trypsin 10X solution Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Dopo 30 minuti, è stato aggiunto FBS (Lonza) per inattivare la collagenasi e la tripsina; la

sospensione cellulare è stata passata attraverso una membrana di nylon e le cellule seminate in una fiasca T75. Dopo 120 minuti a 37°C in un incubatore a CO₂ le cellule non attaccate sono state prelevate e scartate (cardiomiociti), mentre le cellule adese alla piastra (prevalentemente fibroblasti) sono state lavate con DMEM e cresciute in un medium contenente DMEM, medium-199 e FBS in proporzione 7:2:1, addizionato di L-glutamina 200mM 1% (Lonza) e antibiotici 1% (Penicillina 5000 unità -streptomicina 5000 µg, Lonza).

Una volta confluenti, le cellule sono state staccate utilizzando tripsina allo 0.02% (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) e seminate alla concentrazione di 10000 cells/cm². Tutti gli esperimenti sono stati effettuati su fibroblasti cardiaci neonatali tra il passaggio 2 e il passaggio 5, dopo averli tenuti 24h in un terreno composto da DMEM e glutamina 1%, al fine di sincronizzare la coltura attraverso la deprivazione dei nutrienti.

Per verificare la natura fibroblastica di queste cellule, a ogni isolamento si sono analizzate in immunofluorescenza una parte delle cellule attraverso anticorpi specifici: anticorpo policlonale anti-fattore VII (Dako), anticorpo monoclonale anti desmina (Cell Signaling), anticorpo monoclonale anti vimentina (Cell Signaling), capaci di identificare rispettivamente le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e i fibroblasti.

3.3 - HBR

HBR è un glicocongiugato, estere tra i gruppi idrossili dell'acido ialuronico (HA) e i gruppi carbossilici degli acidi butirrici (BU) e retinoico (RA). La procedura per la sintesi e la caratterizzazione dell'HBR e la relative struttura chimica, sono riportate in dettaglio altrove (Ventura, C. et al., 2004). Il gruppo ossidrilico in posizione 6 del residuo N-acetil-D-glucosammina residui nello scheletro del polisaccaride è il più reattivo verso l' esterificazione. Il grado di sostituzione (DS) è stato considerato come il numero dei gruppi esterificati OH per ciascuna unità di ripetizione di acido ialuronico (dimero Glc-NAC-GlcUA). Tutti gli HBR sintetizzati mostrano una DS di BU (DSBU) compreso tra 0,05 e 1,5, mentre il DS di RA (DSRA) è compreso tra 0,002 e 0,1. Il rapporto DSBU / DSRA è di almeno 6. La massa molecolare media di HBR, indicato come la massa molecolare media di ialuronato di sodio, è stata determinata in cromatografia ad esclusione dimensionale ed è compresa tra 10.000 e 30.000 dalton (Ventura, C. et al., 2004). Nel HBR utilizzato nel presente studio, DSBU e DSRA è 1.44 e 0.032, rispettivamente.

3.4 - Saggi di crescita e vitalità cellulare

1- MTT. Il saggio MTT (acronimo di *bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*) è un saggio colorimetrico in grado di valutare l'attività degli enzimi cellulari, mitocondriali in particolare, in grado di ridurre l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. L'enzima mitocondriale che presiede questa reazione, la Succinato Deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle cellule vitali, permettendo di correlare l'attività dell'enzima alla quantità di cellule presenti.

Per valutare la crescita cellulare, i fibroblasti sono stati seminati alla concentrazione di 2×10^5 /well, in pozzetti da 48 (MW 48), starvate per 24h. Dopo 24h, 48h, 72h, 96h di trattamento con o senza HBR, è stato aggiunto al terreno MTT (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), le cellule sono state coltivate per ulteriori 3h, per permettere la metabolizzazione del composto, ed è stato infine aggiunto il buffer di lisi, contenente 10% SDS e 0.01M HCl, e le piastre lasciate in incubatore per una notte al fine di permettere la completa lisi dei cristalli di formazano. La mattina dopo sono state lette le assorbanze in un lettore a piastre a una lunghezza d'onda di 570nm.

2- Attività della caspasi 3. Le caspasi sono enzimi che si attivano quando la cellula entra in apoptosi. Si dividono in caspasi "iniziatrici" (caspasi-2, -8, -9, -10) che tagliano pre-forme inattive di altre caspasi dette "effettrici" (caspasi-3, -6, -7) attivandole; le caspasi effettrici a loro volta tagliano precisi substrati proteici dando corso al processo apoptotico. La caspasi 3 è l'ultima effettrice ad essere attivata, e dalla sua attivazione in poi l'apoptosi è irreversibile. L'attività di questo enzima è quindi correlabile con il numero delle cellule apoptotiche. L'attività della caspasi 3 è stata quantificata utilizzando un kit in commercio (Fluorimetric Caspase 3 Assay Kit, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), seguendo le indicazioni della ditta. I fibroblasti trattati e non trattati con HBR per tempi differenti sono stati raccolti e il pellet cellulare lisato in 35µl di lysis buffer fornito nel kit. Dopo incubazione, le cellule lisate vengono centrifugate e i surnatanti trasferiti in un nuovo tubo. 5µl di lisato sono stati utilizzati per l'analisi, trasferiti in una piastra da 96 e addizionati con 200µl di reaction mix contenente il substrato peptidico acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcoumarina (Ac-DEVD-AMC). Dopo 2 ore di reazione, il substrato AMC viene idrolizzato dalla caspasi 3 rilasciando 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) fluorescente. La fluorescenza è stata letta con Fluorimeter Victor 1 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 360 nm e di emissione a 460 nm. La concentrazione di AMC rilasciato è stata normalizzata su

una curva di taratura costruita analizzando quantità AMC standard definite.

3- rilascio di LDH. L'enzima Lattato deidrogenasi (LDH) è l'enzima cellulare capace di convertire il piruvato in lattato. Quando le cellule muoiono per necrosi, la rottura della membrana cellulare libera l'enzima nel surnatante, rendendolo disponibile e attivo. La presenza dell'enzima nel surnatante è messa in evidenza sfruttando la sua capacità di ridurre il NAD a NADH; la quantità di NADH prodotto viene misurata tramite un saggio colorimetrico in commercio (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich). Fibroblasti cardiaci sono stati seminati in MW6 e trattati con e senza HBR per diversi tempi. Sono stati raccolti i surnatanti e centrifugati a 10000 x g per 15 minuti a 4 °C. Le cellule sono state staccate, pellettate e digerite in 20 µl di Lysis buffer fornito dal kit. 50µl di surnatante e 2µl di lisato cellulare sono stati posti in 96well ed è stato aggiunto assay buffer. La piastra viene letta dopo 2h a 450nm. La quantità di LDH nel surnatante viene normalizzata sulla quantità di LDH totale determinata dalla somma dell'LDH del pellet sommato all' LDH del surnatante.

3.5 - Valutazione del quantitativo di collagene

Il contenuto di collagene totale prodotto dalle cellule è stato valutato usando un kit commercialmente disponibile, Sircol Collagen Assay Kit (Biocolor Ltd., Carrickfergus, County Antrim, UK) seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. Le cellule sono state coltivate in T25 per 4 e 7 giorni. Dopo aver rimosso il medium, 3 ml di acido acetico 0.5 M contenente pepsina 0.1 mg/ml, è stato aggiunto alle colture cellulari per 12h a 4°C. Il giorno seguente i lisati sono stati raccolti, centrifugati e il collagene è stato fatto precipitare aggiungendo NaCl 4M ai campioni; viene poi aggiunto 1 ml di Sircoll dye reagent, molecola in grado di intercalarsi al collagene colorandolo. Dopo 30 minuti, gli estratti sono stati risospesi in 1ml di alkali buffer e la densità ottica valutata a 540nm con uno spettrofotometro. I valori di collagene sono stati riferiti a una curva standard di collagene, fornito dalla ditta produttrice.

3.6 - Zimografia

La zimografia è una tecnica elettroforetica su gel di poliacrilammide che permette la visualizzazione del numero e del peso molecolare approssimativo delle proteasi in un campione, in

base all'idrolisi del substrato specifico che viene incorporato nel gel. Nel caso delle gelatinasi, MMP-9 ed MMP-2, il substrato utilizzato è la gelatina alla concentrazione finale dello 0,1%. La degradazione della gelatina è resa visibile colorando il gel con colorante contenente Coomassie Brilliant Blue G-250. Dove le metalloproteasi hanno digerito la gelatina contenuta nel gel, la colorazione risulterà meno intensa.

I fibroblasti cardiaci sono stati trattati con o senza HBR per diversi tempi e da con diverse concentrazioni; sono stati quindi raccolti sia i surnatanti che i pellet, e questi ultimi lisati in 30µg di buffer di lisi M-Per. La zimografia è stata effettuata in un gel di SDS-poliacrilamide contenente gelatina (1mg/ml). Ai campioni viene aggiunto il loading buffer 4X, contenente Tris base 1M, 20% Glicerolo (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), SDS 0.8g/10ml, blu di bromofenolo 0.24% and 2BME 2-Mercaptoetanololo), e sottoposti ad elettroforesi senza bollitura, in modo da non denaturare e quindi inattivare le proteine. In un contenitore di vetro, il gel è stato lavato con H₂O contenente 2.5% Triton X-100 per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente il gel contenente la gelatina è stato incubato tutta la notte, a 37°C, in 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, contenente 0.02% NaN₃, 5 mM CaCl₂. Dopo diversi lavaggi, il gel è stato immerso in una soluzione di fissaggio/decolorazione (fixing/destaining solution), contenente metanolo:acido acetico:H₂O in proporzione 4.5:1:4.5, prima di essere colorato in una soluzione 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Il gel viene poi scannerizzato ed il grado di attività delle MMP valutato tramite densitometria delle bande ottenute dalla digestione della gelatina.

3.7 - ELISA

Il saggio ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) è in grado di rilevare la presenza di una sostanza sfruttando la reazione antigene-anticorpo, con un anticorpo primario legato alla piastra di analisi, a cui si lega l'antigene. La rivelazione è ottenuta aggiungendo un secondo anticorpo, reattivo contro l'antigene e coniugato con un substrato evidenziabile attraverso una reazione colorimetrica.

Per investigare la produzione di SDF1a, CTGF e VEGF, i fibroblasti cardiaci sono stati coltivati per tempi diversi con o senza concentrazioni crescenti di HBR, e i surnatanti sono stati raccolti. L'analisi è stata effettuata con kit disponibile commercialmente (Cell Signaling) in accordo alle istruzioni del costruttore. Brevemente, 200µl di surnatante sono stati testati in una piastra ELISA e il contenuto di citochina normalizzato sul numero di cellule corrispondenti ad ogni pellet.

3.8 - Real-time PCR

La Real time PCR è un metodo di amplificazione (PCR) e quantificazione simultanee del DNA. Il DNA è amplificato da reazioni a catena dell' enzima DNA-polimerasi; dopo ogni round di amplificazione, il DNA è quantificato. Il metodo comune di quantificazione usato da noi sfrutta l'uso di intercalanti fluorescenti, capaci di legarsi al DNA a doppio filamento. La Real time PCR è combinata con la retro-trascrizione (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento, cDNA, (complementary DNA) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie di RNA.

L'RNA totale è stato estratto usando RNeasy micro kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), in accordo con le istruzioni del produttore. 1µg di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA in una miscela di reazione contenente una retrotrascrittasi inversa, la SuperScript™ III reverse transcriptasi (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Per testare l'espressione genica, 2 µl di cDNA sono stati usati per la Real Time PCR, utilizzando il Lightcycler system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) e con il SYBR Green I FastStart kit (Lightcycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I), il fluoroforo rilevato dal sistema. Come primer sono stati utilizzati iQuantiTech primer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e, in particolare, primer per: MMP-9, MMP-2, Col1a1, Col1a2, α -sma, e CTGF. I dati sono stati normalizzati usando la GAPDH come indice del contenuto di cDNA dopo la trascrizione inversa. L'amplificazione include una fase iniziale di denaturazione a 95 °C for 10 min, 50 cicli di denaturazione a 95°C per 10 secondi, un annealing a 56 °C per 6–10 secondi, e una estensione a 72 °C per 10 secondi, con una transizione di temperatura di 20 °C/s. La fluorescenza è stata misurata alla fine di ogni step di estensione. La specificità del prodotto è stata determinata dall'analisi della curva di melting, effettuata alla fine del periodo di estensione, attraverso una scala di temperatura crescente da 55 a 95°C con una transizione di temperatura 0.1 °C/s e con un monitoraggio continuo della fluorescenza. I campioni sono stati corsi in duplicato, e il Ct medio è stato usato per il calcolo. La quantificazione relativa dell'RNA è stata calcolata usando attraverso il metodo comparativo detto "metodo delta-delta Ct " (Pfaffl M. 2001).

3.9 - Saggio di attività delle HDAC

Per verificare l'inibizione delle iston deacetilasi, è stato usato un kit commercialmente disponibile, Fluorimetric HDAC Activity Assay kit (BioVision Research Products, Mountain View, CA, USA). I fibroblasti cardiaci sono stati trattati con o senza HBR per tempi differenti; i pellet sono stati lisati in 35µl M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). 30µg di lisato cellulare sono stati testati in accordo con le istruzioni della ditta. I campioni sono stati uniti con un substrato fluorimetrico per le HDAC in piastre da 96 diluito un assay buffer, entrambi forniti dal kit. Dopo 2 ore di incubazione a 37 °C, la reazione è stata fermata e la fluorescenza letta alla frequenza di eccitazione di 360 nm e emissione a 460 nm. Una curva standard è stata calcolata utilizzando un substrato deacetilato fornito dal produttore.

3.10 - Western blot

Il western blot è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici; le proteine vengono prima separate in base al loro peso molecolare utilizzando un gel di poliacrilamide, trasferite su di un supporto, cioè una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Fibroblasti cardiaci sono stati trattati con o senza HBR a tempi e concentrazioni diverse. I pellet cellulari sono stati lisati in 50µl di M-per, quantificati mediante Bradford e uniti a loading budder 4X, contenete 1M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerolo, 1% β-mercaptoetanol, 12.5mM EDTA, e bolliti per 5 minuti. 15µg di proteina sono stati corsi mediante elettroforesi in un gel di poliacrilamide. Il gel è stato trasferito (blottato) in una membrana di nitrocellulosa 0.2 µm. Dopo diversi lavaggi in PBS-Tween 0.05% e saturazione in latte, le membrane vengono lasciate a contatto con l'anticorpo primario tutta la notte. La rivelazione è stata fatta il giorno successivo tramite l'aggiunta di un anticorpo secondario coniugato a una perossidasi (Cell Signaling).

Per visualizzare il complesso antigene anticorpo, si è sfruttata la reazione catalizzata dalla perossidasi, usando ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare), in accordo con le indicazioni del produttore.

Gli anticorpi utilizzati sono stati: anti-CTGF (Cell Signaling) e anti-TIMP2 (Santa Cruz technology).

3.11 - Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza permette la rilevazione di determinati antigeni presenti nelle cellule. Su cellule opportunamente fissate, si pone l'anticorpo specifico per l'antigene da analizzare. Si possono utilizzare sia anticorpi direttamente coniugati a molecole fluorescenti (fluorocromi, ad es. FITC, TRITC, PE, ecc.) ed in questo caso si parla di immunofluorescenza diretta, oppure la reazione antigene anticorpo viene evidenziata utilizzando un secondo anticorpo, specifico per il primo anticorpo, coniugato ad un fluorocromo, in questo caso si parla di immunofluorescenza indiretta. Il campione viene poi analizzato mediante microscopio a fluorescenza.

Le analisi di immunofluorescenza sono state eseguite sia su colture cellulare al passaggio 1 per verificarne la natura fibroblastica delle cellule sia su cellule trattate e non trattate con HBR per tempi diversi. Le cellule sono state lavate con PBS e fissate in acetone metanolo 7:3 per 15 minuti. Dopo essere state fissate, sono state lavate e permeabilizzate con 0.2% di Triton X-100 in ghiaccio per 15 minuti. Il legame con anticorpi specifici è stato impedito saturando per 1h a 37 °C con albumina da siero bovino, BSA, 1%. Le cellule sono state marcate con anticorpi primari specifici o/n a 4°C, e il giorno successivo sono stati aggiunti anticorpi secondari coniugati a fluorescina. La visualizzazione dei nuclei è stata effettuata mediante DAPI.

Gli anticorpi utilizzati sono stati anti-vimentina, anti-desmina e anti-Ki67 (Cell Signaling).

3.12 - Saggio di Migrazione

La capacità migratoria delle cellule è stata valutata mediante uso di transwell con porosità 8µm. Cellule trattate con o senza HBR a diverse concentrazioni per 24h in T25, sono state recuperate e poste con il loro terreno nella parte superiore di un transwell per successive 24h, in incubatore a 37°C, su un agitatore orbitale. Finito questo periodo, i transwell sono stati prelevati e le cellule rimaste nella parte superiore rimosse con un batuffolo di cotone, di modo che fosse possibile visualizzare solo le cellule migrate nella parte inferiore della membrana. Le membrane vengono fissate in acetone: metanolo 7:3, e visualizzate tramite colorazione con cristal violetto e contate.

4 - Risultati

4.1 - Isolamento dei fibroblasti cardiaci neonatali di ratto

Le cellule sono state isolate da cuori di ratti sacrificati 3 giorni dopo la nascita, come descritto nel capitolo Materiali e Metodi. Brevemente, dopo aver digerito enzimaticamente i cuori, le cellule estratte sono state seminate e le prime ad attaccarsi sono fibroblasti cardiaci neonatali, chiamati CF. Dopo aver rimosso le cellule non adese 2 ore dopo la semina, il terreno è stato cambiato, e i fibroblasti di questa prima semina sono considerati un passaggio 0, P0.

Le cellule così isolate sono mantenute in coltura, in terreno specifico, DMEM-M199-FBS, e il terreno cambiato ogni 2 giorni. Una volta nuovamente raggiunta la confluenza le cellule vengono passate in proporzione 1:3, riseminate (P1) e, di nuovo, il terreno cambiato ogni 2 giorni. Una volta confluenti, le cellule sono pronte per gli esperimenti. Parte delle cellule staccate a P1 vengono seminate su vetrini per la caratterizzazione in immunofluorescenza (Figura R1-AeB). Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti dal passaggio 2 fino al P5.

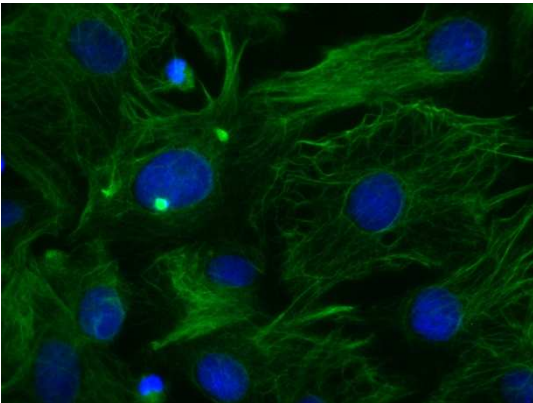


Figura R-1A. Positività alla vimentina

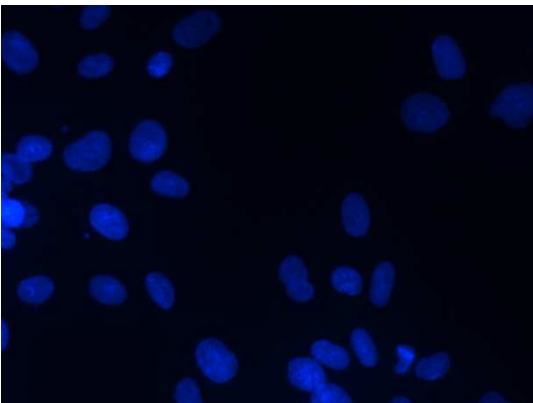


Figura R-1. negatività alla desmina

4.2 - Crescita cellulare

Una volta accertata la natura fibroblastica di queste cellule, si è proceduto a testare l'effetto di HBR su vitalità e crescita. In figura R2 sono mostrati i risultati relativi ai test condotti: in particolare, MTT (figura R2 - A), saggio dell'attività delle caspasi 3 (B), quantificazione dell' LDH (C).

I fibroblasti cardiaci sono stati trattati con concentrazioni di HBR da 0 g/l a 2 g/l, per 24h, 48h, 73h, 96h fino a 120h e la proliferazione cellulare è stata valutata tramite MTT. La concentrazione 0.25g/l si è dimostrata inefficace nell'inibire la crescita cellulare, mentre la concentrazione 2g/l era citotossica, provocando la morte delle cellule già dopo 48h. Come si può vedere dalla figura R2 pannello A, dopo 24h solo alla concentrazione 0.5g/l il numero di cellule è significativamente diverso dal controllo (* ,p <0.05%), mentre per le concentrazioni da 0.5g/l a 1.5g/l, il calo, anche se presente, non è significativo. Dalle 48 ore in poi, a tutte le concentrazioni di HBR, le cellule risultano significativamente meno dei controlli. La proliferazione è arrestata in modo non dose dipendente. Si è ipotizzato, quindi, che HBR fosse in grado, in concentrazioni comprese tra 0.5g/l e 1.5g/l, di arrestare la crescita cellulare senza però uccidere le stesse, in quanto il loro numero è sempre in aumento rispetto al numero rilevato al tempo zero.

Per confermare l'ipotesi della non tossicità cellulare, si è valutato sia il numero di cellule apoptotiche che necrotiche. Il saggio di attività della caspasi 3 (B), usato per valutare l'apoptosi, mostra come alla minima concentrazione efficace (0.5g/l) e alla massima tollerata (1.5g/l), la caspasi 3 venga attivata in modo significativo (* ,p<0.05%) rispetto alla quantità attiva nel controllo, durante le prime 12h di trattamento, portando probabilmente ad una certa mortalità cellulare in questa prima fase. Al contrario, dopo 24h, la quantità di caspasi attiva nei trattati è significativamente ridotta rispetto ai controlli, e rimane inferiore per tutti i giorni successivi, fino a 5 giorni dopo il trattamento. Il quantitativo di cellule necrotiche, valutate con LDH, è significativamente inferiore rispetto ai controlli, per tutta la durata del trattamento (* ,p <0.05%).

In conclusione, HBR si è dimostrato essere in grado di arrestare il ciclo cellulare, senza indurre apoptosi o necrosi in modo significativo, nelle concentrazioni comprese tra 0.5 e 1.5 g/l, in modo non dose dipendente.

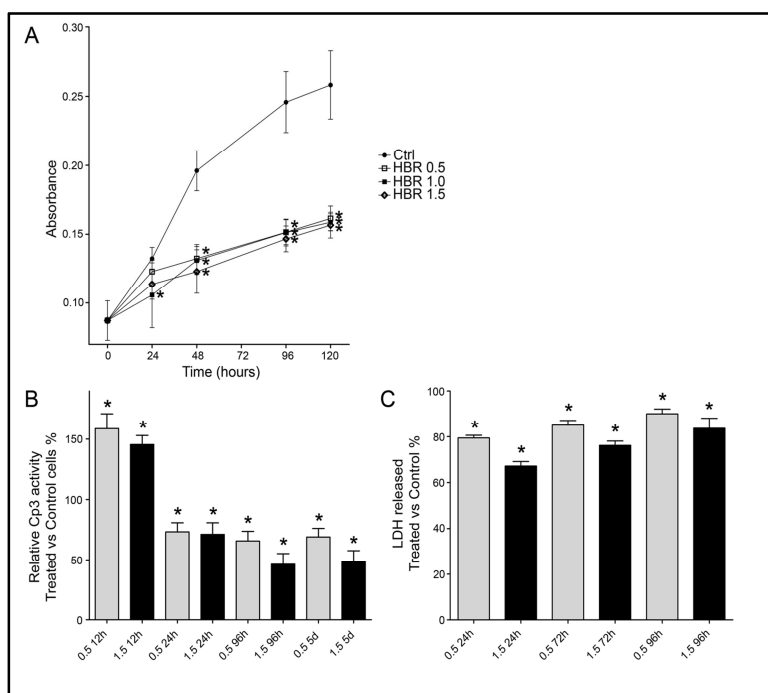


Figura R-2. Effetto di HBR sulla proliferazione e vitalità. (A) Proliferazione valutata con MTT per i tempi e le dosi indicate; (B) Attività ,normalizzate sul controllo. (C)Quantitativo di LDH rilasciato nel medium, normalizzato sul controllo. Per tutti e tre i saggi: n=4; *Significativamente diverso dal controllo, $p < 0.05$

4.3 - Analisi in immunofluorescenza di cellule trattate e non trattate con HBR

Una prima analisi in immunofluorescenza è stata condotta su fibroblasti seminati su vetrini e trattati e non trattati con HBR 0.5g/l e 1.5g/l per 48h, usando come anticorpo Ki67, antigene nucleare espresso nelle cellule proliferanti. Come mostrato in figura R3, la marcatura mette in evidenza come le cellule trattate con HBR la proteina sia sottoespressa rispetto ai controlli, confermando l'analisi condotta sulla proliferazione mostrata nel paragrafo precedente.

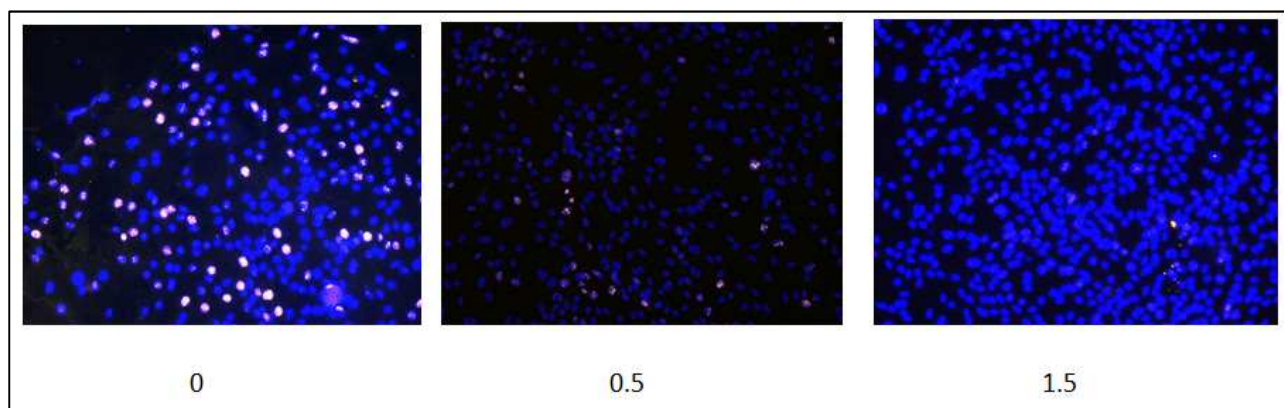


Figura R-3. Cellule trattate o no con HBR 0.5 o 1.5 per 48h e marcate con ki67

Un secondo gruppo di fibroblasti è stato trattato e non con HBR 0.5g/l o 1.5g/l per 7 giorni, dopo i quali è stata eseguita l'immunofluorescenza, per verificare se i marker tipici della popolazione cellulare in esame venissero in qualche modo modificati dalla molecola. L'indagine in immunofluorescenza ha messo in evidenza come questo non accada (figura R4), rimanendo fibroblasti a tutti gli effetti. Difatti la vimentina (marker fibroblastico) rimane fortemente positiva, mentre la desmina (marker delle cellule muscolari lisce) negativa.

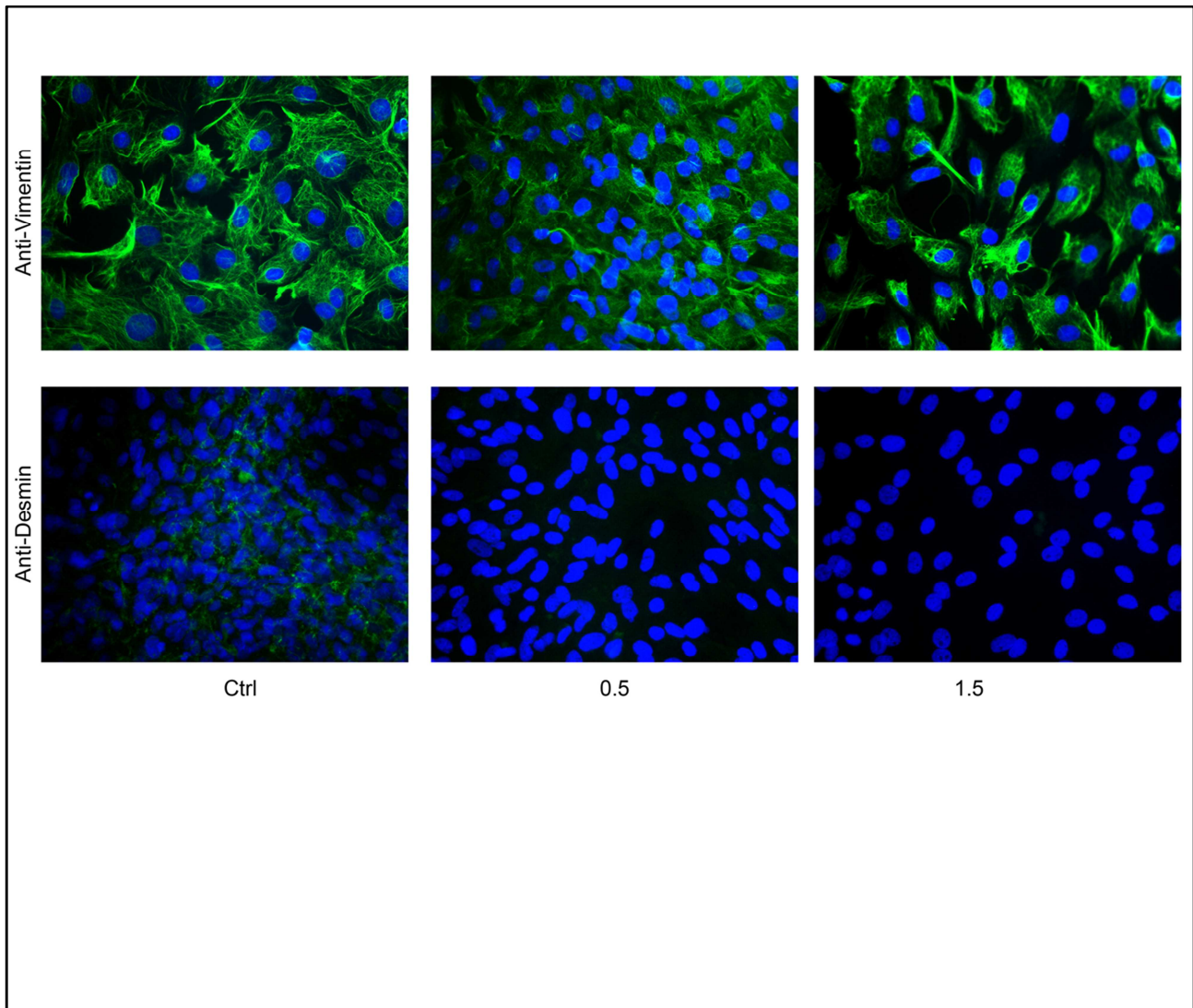


Figura R-4. Immunofluorescenza con anticorpi anti-vimentina (positivo) e anti-desmina (negativo)

4.4 - Espressione genica

L'espressione genica è stata valutata mediante Real-Time PCR, scegliendo come concentrazioni da testare 0.5g/l e 1.5g/l. Le cellule sono state trattate per 24h, 48h, 96h e 5d. L'RNA è stato estratto, retrotrascritto e amplificato.

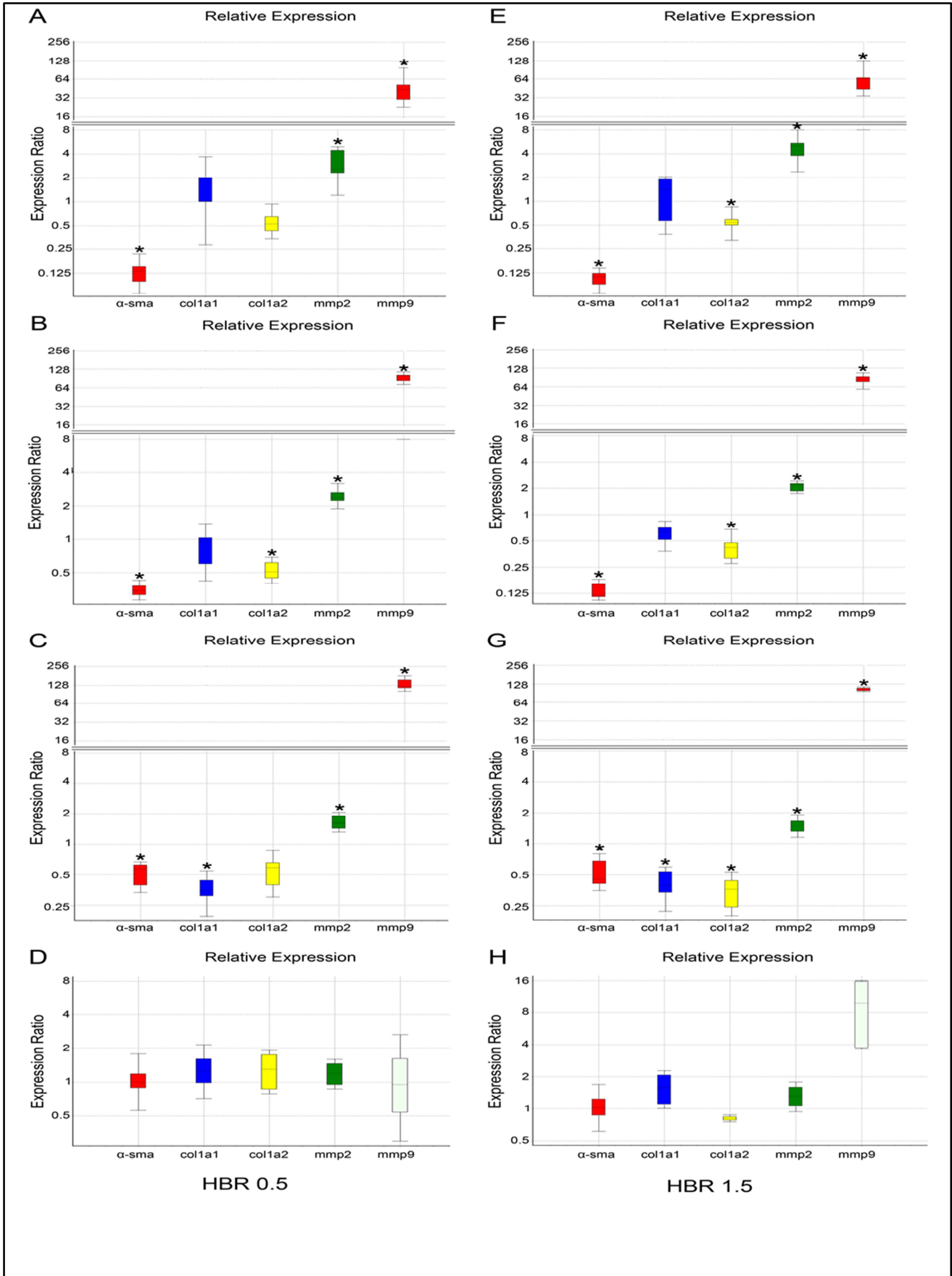
Si è scelto di analizzare l'espressione di geni coinvolti nella sintesi e nella demolizione della matrice extracellulare. In particolare si è studiata la modulazione di col1a1 e col1a2, due geni codificanti per catene del collagene di tipo I, che risulta particolarmente aumentato nella prima fase della fibrosi. Per quanto riguarda la demolizione dell' ECM, si sono guardate le metalloproteasi 2 e 9, capaci, una volta secrete, di degradare il collagene. Inoltre abbiamo verificato come si modificasse l'espressione di α -sma, proteina coinvolta nella progressione verso un fenotipo miofibroblastico. In un set di esperimenti separati si è valutata anche l'espressione di CTGF, citochina che, quando secreta dai fibroblasti, induce rapidamente fibrosi cardiaca.

Come si può vedere in figura R5, già dopo 24h HBR è in grado di modificare l'espressione genica delle cellule trattate e l'effetto mantenuto per i giorni successivi, per poi esaurirsi al giorno 5. In particolare le metalloproteasi risultano maggiormente espresse, mentre i geni coinvolti nella sintesi del collagene sono sottoespressi. Anche α -sma risulta sottoespressa, facendo ipotizzare un arresto della progressione verso fenotipi miofibroblastici delle cellule trattate. Per quanto riguarda l'espressione di CTGF (Figura R6), anche questa risulta diminuita.

La regolazione dell'espressione genica ci induce a ipotizzare che HBR svolga un'azione inibitoria nei confronti della progressione fibrotica, sia riducendo l'espressione di geni coinvolti nella sintesi del collagene, sia aumentando l'espressione di geni codificanti proteine coinvolte nella sua demolizione. Inoltre la diminuzione della trascrizione di una citochina in grado di regolare in modo paracrina e autocrino la fibrosi, quale CTGF, rafforza questa ipotesi. In ultimo HBR sembra arrestare la progressione verso un fenotipo fibroblastico, inibendo la trascrizione α -sma. HBR ha quindi, nel complesso, un'azione antifibrotica, svolta su più fronti.

Figura R-5. Effetto di HBR sull'espressione genica valutata in Real time PCR.(A-D) Espressione genica relativa di fibroblasti cardiaci trattati con 0.5g/l di HBR confrontati con cellule non trattate a 24h(A), 48h (B), 96h (C) e 5giorni (D).(E-H) Espressione genica relativa di fibroblasti cardiaci trattati con 1.5g/l di HBR confrontati con cellule non trattate a 24h (E), 48h (F), 96h (G) and 5d (H).

**Significativamente differente dal controllo $p < 0.05$., $n =$*



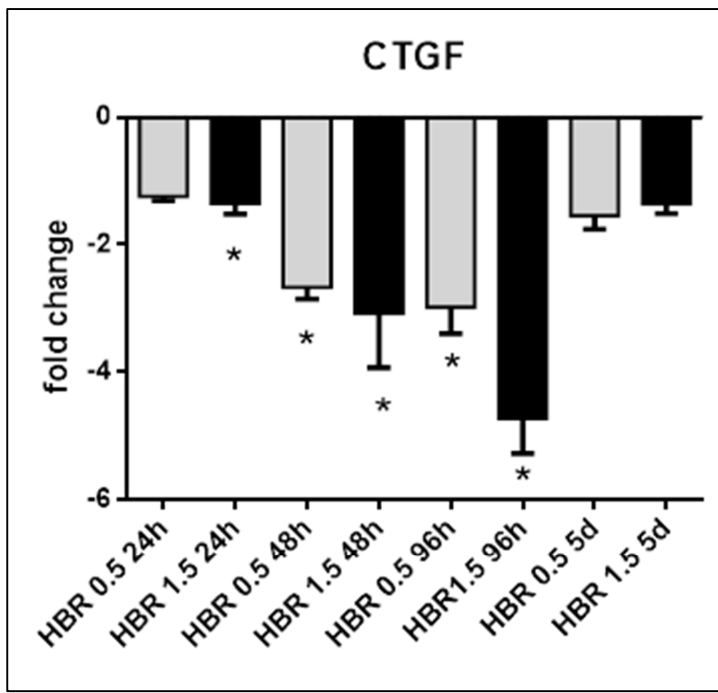


Figura R-6. Effetto di HBR sull'espressione genica valutata in Real time PCR su fibroblasti cardiaci trattati con 0.5g/l o 1.5g/l di HBR confrontati con cellule non trattate a 24h, 48h, 96h e 5 giorni.

*Significativamente differente dal controllo $p < 0.05$. $n=3$

4.5 - Deposizione dell' ECM

Si è voluto poi verificare se il cambiamento nell'espressione di geni coinvolti nell'omeostasi dell'ECM, corrispondesse anche a un cambiamento nell'espressione proteica.

Si è in primo luogo studiato il quantitativo di collagene depositato dalle cellule e presente nelle fiasche di coltura. Come si può vedere in figura R7(D), il collagene depositato dalle cellule trattate risulta significativamente diminuito dopo 4 giorni, fino a 7 giorni dopo il trattamento.

La secrezione di MMP è stata studiata mediante zimografia (B). Questa tecnica permette di quantificare l'attività delle metalloproteasi presenti nel medium, proporzionale alla loro quantità. L'esperimento è stato ripetuto 3 volte, le bande quantificate con densitometria. Come mostrato in Figura R7 (A), già dopo 48h la secrezione di MMP9 risulta aumentata, anche se in modo non significativo, risultando invece significativa dopo 96h (* , $p < 0.05$, * * < 0.01 , * * * < 0.001 %).

Si è valutata anche la presenza di Timp2, l'inibitore delle metalloproteasi, mediante Western Blot. Nessuna differenza significativa è stata notata, facendo supporre che all'aumento delle metalloproteasi corrisponda anche un effettivo aumento della degradazione della matrice.

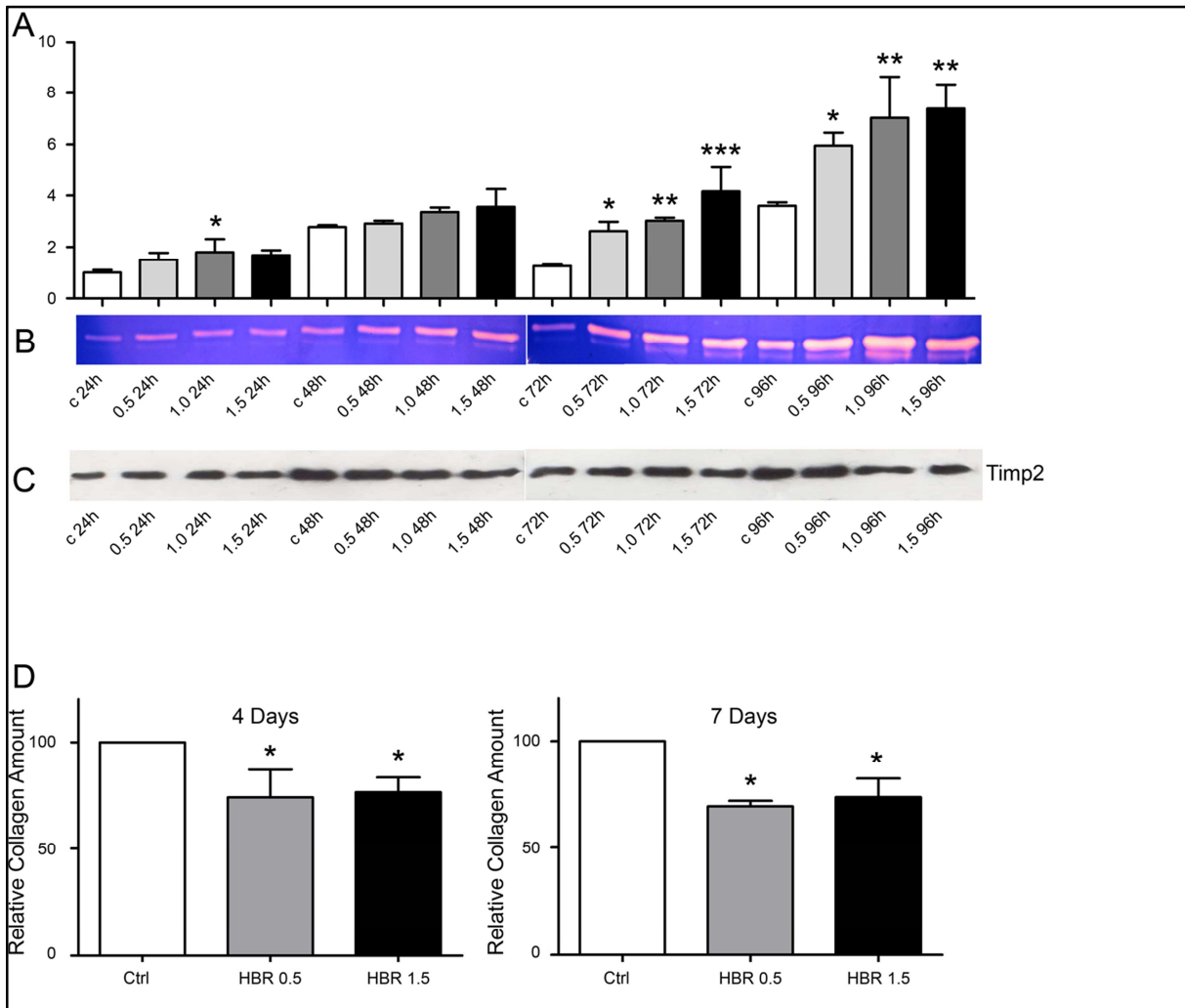


Figura R-7. Effetto di HBR sui marker coinvolti nella deposizione di ECM e nell'omeostasi.

(A) Zimografia di medium condizionati raccolti da fibroblasti trattati con dosi crescenti di HBR da 24h a 96h, (rappresentativa di $n=3$) e (B) quantificazione densitometrica di 3 esperimenti separati. La quantità di campione caricato è normalizzata sul numero di cellule.

(C) Western blot di TIMP2 secreto nel medium; Il quantitativo di surmatante caricato è normalizzato sul numero di cellule; rappresentativo di $n=4$

(D) Quantitativo di collagene depositato dopo 4 e 7 giorni di trattamento con HBR ($n=4$)

*Significativamente differente dal controllo, $p<0.05$.

4.6 - Migrazione

La capacità migratoria delle cellule è stata valutata tramite l'uso di transwell. Per accentuare le differenze tra le cellule trattate e non trattate si è utilizzato LPS, un induttore della migrazione.

Le cellule sono state trattate senza HBR, con HBR 0.5g/l o HBR 1.5g/l per 24h, staccate e messe in transwell con porosità 8µm e lasciate in incubatore per 16h su un agitatore basculante, per permettere la migrazione. Dopo aver rimosso le cellule non migrate, i fibroblasti presenti nella parte inferiore della membrana sono stati colorati con Cristal violetto e contate. In figura R9 sono mostrati i risultati dell'esperimento come sono stati visualizzati al microscopio, mentre in figura R8, il grafico mostra la media di 4 esperimenti. Come si può vedere, HBR è in grado di diminuire la migrazione basale dei fibroblasti, in modo significativo alla concentrazione più alta. L'induzione con LPS rende ancora più evidente l'effetto di HBR, in quanto anche la concentrazione più bassa della molecola (0.5 g/l) è già in grado di reprimere fortemente la migrazione, effetto ancora più evidente con HBR 1.5g/l.

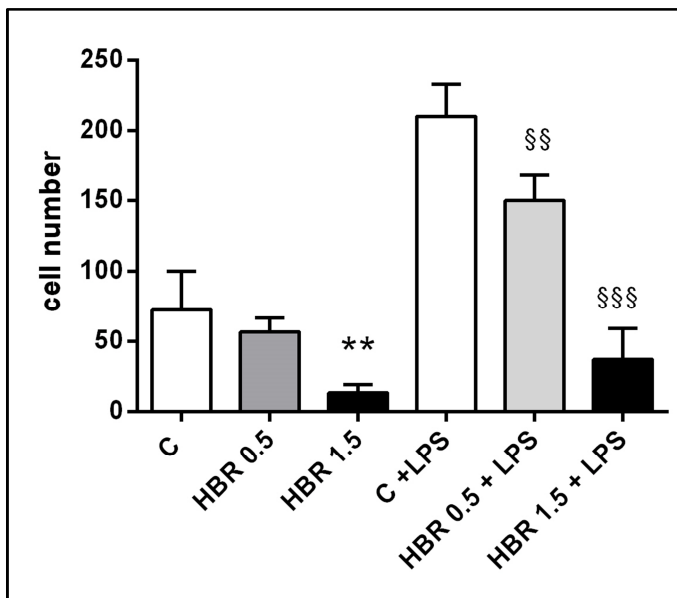


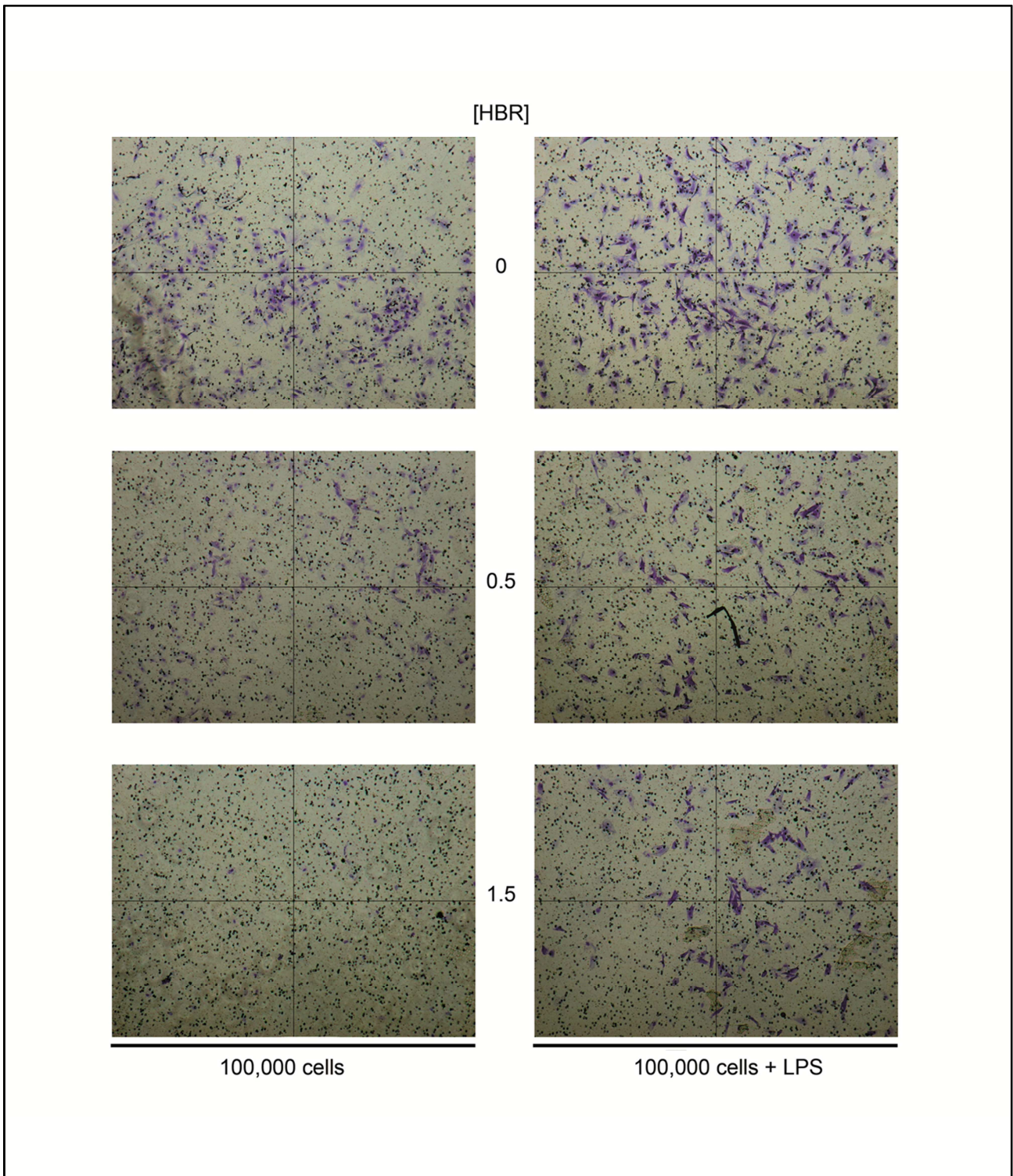
Figura R-8. Effetto di HBR sulla migrazione cellulare. Cellule trattate e non trattate con HBR 0.5g/l e 1.5g/l per 24h sono lasciate migrare per ulteriori 16h in una camera di Boyden modificata.

**Significativamente diverso da controllo C, $p < 0.01$

§§ Significativamente diverso dal controllo C+LPS, $p < 0.001$

§§§ Significativamente diverso dal controllo C+LPS, $p < 0.0001$

Figura R-9. Effetto di HBR sulla migrazione cellulare. Cellule trattate e non trattate con HBR 0.5g/l e 1.5g/l per 24h sono lasciate migrare per ulteriori 16h in una camera di Boyden modificata, colorate con Cristal Violetto e visualizzate al microscopio.



L'aumento della capacità migratoria dei fibroblasti è legata ad una loro attivazione in seguito a stimoli esterni ed è anche il primo segnale della loro conversione a miofibroblasti. HBR è dunque in

grado di diminuire l'intensità migratoria basale dei fibroblasti solo ad alte concentrazioni, mentre a tutte le concentrazioni è in grado di deprimerla in risposta a stimoli esterni, quali l'LPS, senza però reprimerla totalmente.

4.7 - ELISA

La secrezione di citochine è analizzata attraverso saggio ELISA dei surnatanti di cellule trattate e non con HBR a concentrazioni crescenti, da 0.25g/l a 1.5g/l.

La secrezione di SDF beta, citochina chemoattrattante per vari tipi cellulari tra cui le cellule staminali, è stata valutata dopo 24 ore, ma risulta leggibile solo dopo 48h e i dati riportati in figura R10. Già a questo tempo, alla concentrazione 1.5g/l la secrezione è significativamente aumentata. Dopo 72h, la quantità di SDF β secreto nel medium è significativamente aumentata per le concentrazioni 0.5g/l e 1.5g/l, e si mantiene fino a 5 giorni.

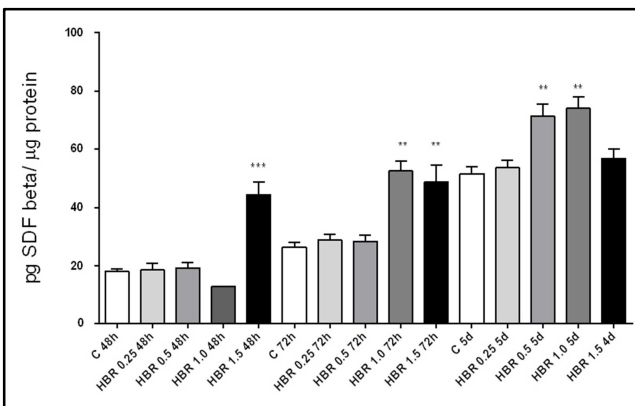


Figura R-10. Secrezione di SDF da parte di fibroblasti cardiaci trattati con dosi crescenti di HBR.

La secrezione di VEGF, citochina fondamentale come promotrice della vascuologenesi, è fortemente indotta dal trattamento con HBR, come si può vedere in Figura R11 a tutti i tempi e a tutte le concentrazioni esaminate, in modo dose dipendente.

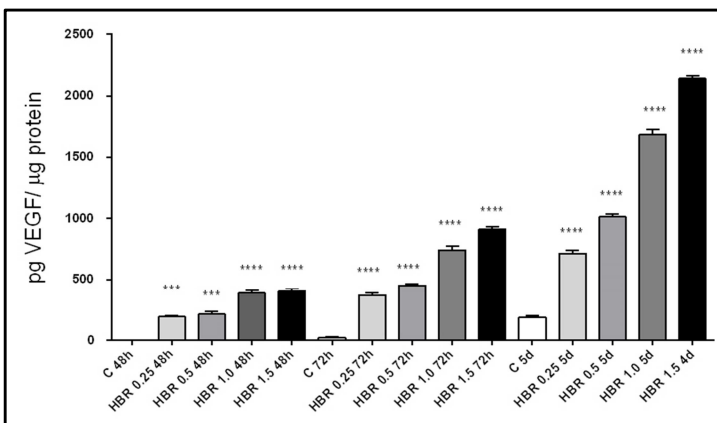


Figura R-11. Secrezione di VEGF da parte di fibroblasti cardiaci trattati con dosi crescenti di HBR

É stata analizzata anche la secrezione della citochina profibrotica CTGF, per confermare i dati di Real Time PCR. Come si vede in figura R12, la diminuzione di CTGF nel medium è già evidente dopo 24h alle concentrazioni 0.5g/l e 1.0g/l, per poi diminuire ulteriormente alle 72h per tutte le concentrazioni. Al giorno 5, solo la dose più alta risulta significativamente inferiore al controllo.

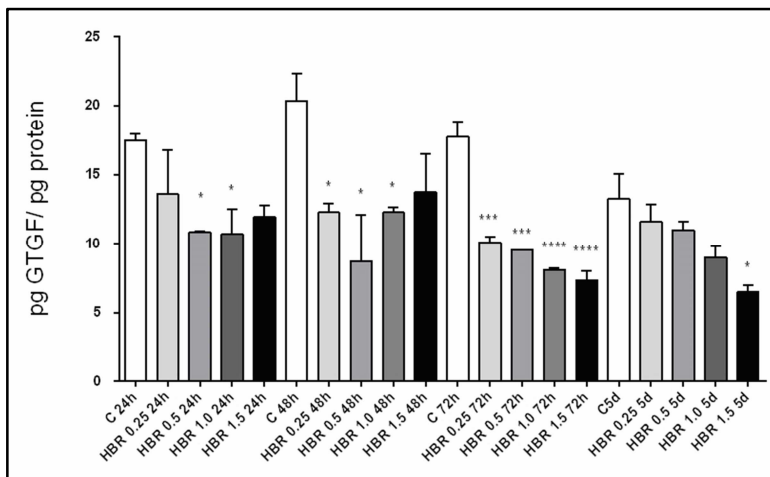


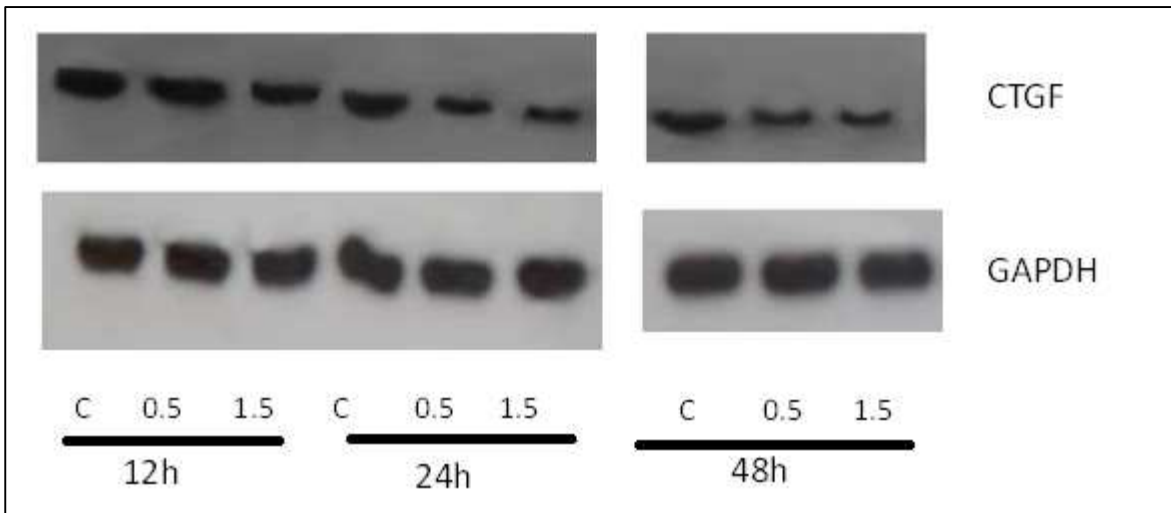
Figura R-12 Secrezione di CTGF da parte di fibroblasti cardiaci trattati con dosi crescenti di HBR

HBR si è dimostrato essere una molecola in grado di modulare la secrezione di diverse citochine, fondamentali per la sopravvivenza del tessuto (VEGF), la cheoattrazione di elementi staminali (SDFbeta) e la riduzione della fibrosi (CTGF)

4.8 - Western Blot

L'analisi di western blot è stata effettuata per CTGF, per verificare se anche la concentrazione intracellulare della citochina fosse modificata dal trattamento con HBR. Come si vede in figura R-13, già dopo 12 h CTGF risulta sottoespressa nelle cellule trattate. L'effetto permane per le successive 48h.

Figura R-13. Wester Blot di CTGF su estratti di cellule trattate con o senza HBR 0.5g/l o 1.5g/l per 12, 24, 48h. Come controllo di carica è stato utilizzata la GAPDH



4.9 - Inibizione delle HDAC

L'inibizione della HDAC è stata valutata su fibroblasti cardiaci trattati e non trattati con HBR 0.5g/l e 1.5g/l per 12h, 24h o 48h. Tutti i risultati sono stati normalizzati sul controllo alle 12 ore. Come si può vedere in figura, già dopo 12 ore HBR è efficace nell'inibire l'enzima, alla concentrazione più bassa di 0.5 g/l; alle 24h entrambe le concentrazioni sono efficaci. La situazione è ribaltata alle 48h rispetto alle 12h, dove solo HBR 1.5g/l risulta ancora attivo. La tempistica dell'inibizione dell'enzima corrisponde a quella rilevata nei cambiamenti dell'espressione genica, facendoci ipotizzare che il grado di acetilazione sia causa di questi ultimi.

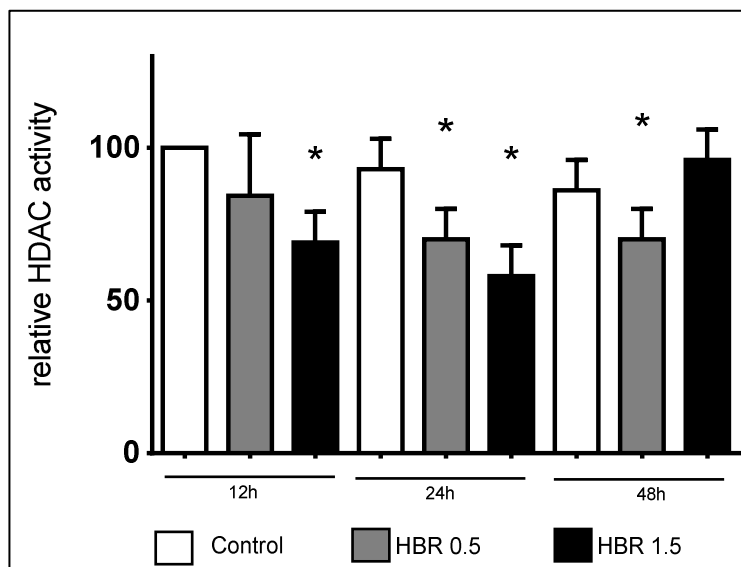


Figura R14- : Inibizione dell'enzima Iston Deacetilasi, HDAC, da parte di HBR a 12h, 24h e 48h alla dose di 0.5g/l e 1.5g/l.

4 - Discussione

La riduzione della fibrosi cardiaca che insorge a seguito di un infarto miocardico acuto risulta essere un importante obiettivo terapeutico. I fibroblasti cardiaci sono i principali attori della sintesi dell'ECM, anche se la loro funzione non si limita a questo. Essi infatti non solo sintetizzano le proteine che vanno a formare lo scaffold del cuore a cui si ancorano tutti gli altri tipi cellulari, ma sono in grado di percepire le modificazioni del microambiente in cui sono immersi e reagiscono modificando la propria attività metabolica, differenziandosi, se necessario, in una popolazione più attiva e reattiva, i miofibroblasti. A seguito di un infarto, i fibroblasti e i miofibroblasti cardiaci, migrano nella zona del danno, prendendo il posto dei cardiomiociti morti durante l'evento acuto. Al fine di riparare la ferita, i fibroblasti secernono grandi quantitativi di collagene e sviluppano al loro interno proteine contrattili che rendono la cicatrice capace di resistere allo stress meccanico applicato dal ventricolo in fase di contrazione. La fibrosi di rimpiazzo che segue l'infarto è necessaria per andare a rinforzare quelle aree necrotiche che altrimenti, assottigliandosi, renderebbero debole l'organo. Nel cuore però l'attività dei fibroblasti non si arresta a cicatrice consolidata, ma continua sia attraverso la deposizione di collagene nell'area danneggiata sia attraverso la secrezione di citochine pro-fibrotiche che portano a fibrosi anche in aree lontane dal danno iniziale, portando a fibrosi interstiziale. È quindi di estremo interesse lo studio di farmaci in grado di reprimere l'attività dei fibroblasti senza però bloccarla, alla ricerca di un compromesso tra fibrosi adattativa e maladattativa.

Nel nostro laboratorio abbiamo sintetizzato un estere misto degli acidi butirrico, retinoico e ialuronico (HBR), nell'ottica di avere a disposizione un agente differenziante, in grado di commissionare cellule staminali in senso cardiomiocitario (Ventura et al., 2007). Lo studio del suo effetto su cellule mesenchimali umane trapiantate in animali sottoposti a infarto sperimentale ci ha spinto a studiare una possibile azione diretta del farmaco. Difatti le cellule staminali trattate con HBR sembrano aiutare l'organo in cui vengono trapiantate, non solo modificando la propria espressione genica in senso differenziativo verso fenotipi cardio-vascolari, ma anche secernendo fattori trofici che aiutano il tessuto ospite. Abbiamo quindi testato l'azione del farmaco su animali sottoposti a infarto sperimentale, due ore dopo la chiusura definitiva della LAD, iniettando direttamente HBR nella zona perinfartuale. I cuori iniettati con HBR hanno dimostrato avere un

miglioramento nelle performance rispetto agli animali non trattati, evidenziata sia in PET che in risonanza magnetica.

Abbiamo quindi cercato di capire come HBR si comporti in relazione alle diverse popolazioni cellulari. In particolare dato l'interesse nella sua capacità di ridurre la fibrosi, abbiamo studiato la sua azione sui fibroblasti cardiaci. Sebbene i fibroblasti rappresentino circa il 70% delle cellule cardiache, esse rimangono quiescenti nella fase Go fino a che non sono stimolati a proliferare (Weber KT et al, 1988). Molte citochine e diversi fattori di crescita stimolano sia la proliferazione dei fibroblasti, sia la deposizione di collagene, e rappresentano un target terapeutico. I nostri studi hanno messo in evidenza come HBR sia in grado di ridurre la proliferazione cellulare, senza però uccidere le cellule. Difatti si ha un arresto della crescita, come mostrato dall'MTT, senza necrosi né attivazione della caspasi 3, se non per un periodo limitato di tempo, ossia nelle prime 12 ore. Questo arresto della proliferazione può favorire una riduzione della cicatrice e quindi limitare la fibrosi di rimpiazzo. HBR si è dimostrato efficace anche nell'inibire la deposizione della matrice extracellulare agendo sia a livello di trascrizione genica che di sintesi proteica. Difatti le cellule trattate con HBR mostrano una diminuzione dell'espressione genica degli mRNA legati alla sintesi di collagene di tipo I (col1a1 e col1a2) sia nella effettiva deposizione di collagene.

La degradazione del collagene è mediata dalle metalloproteasi (MMPs). La secrezione di queste proteine è mediata da citochine, fattori di crescita, ormoni, ecc. L'attività proteolitica delle metalloproteasi dipende principalmente da tre azioni: i) controllo a livello trascrizionale, ossia sulla trascrizione dell'RNA; ii) controllo di attivazione, attraverso proteolisi dei substrati non attivati (pro-MMPs); iii) controllo dell'inibizione, attraverso la sintesi degli inibitori specifici TIMPs. Tutti questi tre fattori possono essere controllati da fattori farmacologici specifici. Sebbene l'incremento delle MMPs nelle cellule trattate con HBR possa sembrare un fattore negativo, in quanto l'aumento di queste proteine risulta avere un ruolo negativo dopo l'infarto e diverse terapie che ne limitano l'aumento sembrano favorire la ripresa dell'organo, ci sono diverse evidenze sperimentali che mettono in evidenza un possibile effetto benefico di questo incremento. Difatti la sovraespressione della mmp9 nella fibrosi polmonare indotta da bleomicina si è dimostrata benefica, con un effetto anti-fibrotico persistente (Cabrera S. et al., 2007). La metalloproteasi 9 è un enzima multifunzionale che partecipa a una grande varietà di pathway fisiologiche e l'idea che sia solo attivato per degradare la membrana basale sembra troppo semplicistica. Difatti, oltre a digerire il collagene, la MMP9 è in grado di attivare mediante taglio

proteolitico la pro-MMP2, La pro-MMP13 e la pro-MMP9. Inoltre modula l'attività di diverse citochine, tra cui SDF-1. L'aumentata produzione di MMPs potrebbe favorire l'ingresso dello staminali circolanti nel tessuto danneggiato, grazie anche all'aumentata espressione di citochine chemoattrattanti.

CTGF è una proteina che, secreta durante la fibrosi da parte dei fibroblasti, induce con un loop autocrino ed esocrino, un aumento dell'espressione di collagene di tipo I, così come di laminina e integrina nei fibroblasti stessi (Frazier K. Et al., 1996). Un aumento di CTGF è stato riscontrato sia in cuori di ratto dopo infarto sperimentale (Ohnishi H. et al., 1998), sia in biopsie di pazienti con cardiomiopatia ipertrofica (Chen MM et al., 2000). Tutte queste evidenze fanno sì che CTGF sia considerato un marker di fibrosi cardiaca e la sua diminuzione mediata da HBR potrebbe rappresentare un obiettivo terapeutico molto importante. HBR riduce la produzione e la secrezione di questa proteina a livello trascrizionale e di sintesi proteica.

Altra importante azione mediata da HBR è l'inibizione della trascrizione di α -sma. L'espressione di questa proteina è caratteristica del differenziamento da fibroblasti a miofibroblasti. È noto come l'attivazione persistente dei miofibroblasti contribuisca a un eccessivo fenomeno di cicatrizzazione con conseguente fibrosi, essendo i miofibroblasti anche maggiormente resistenti alla apoptosi. L'inibizione di questo fenomeno è quindi un importante obiettivo terapeutico. Sempre in quest'ottica di inibizione fibroblasto-miofibroblasto si inseriscono gli esperimenti di migrazione: difatti i fibroblasti hanno un'aumentata capacità migratoria, dovuta all'aumento delle fibre contrattili. HBR sembra inibire questo fenomeno, probabilmente alterando la produzione di queste proteine.

I fibroblasti trattati con HBR diventano inoltre "centrali" di produzione di citochine bioattive, quali VEGF e SDF. Il ruolo di queste due proteine è fondamentale per la sopravvivenza dell'organo. VEGF promuove la vasculogenesi, evitando la diminuzione della densità capillare tipica della fibrosi (Hughes GC et al.) VEGF non stimola solo l'angiogenesi, ma è in grado di ridurre la dimensione dei cardiomiociti nelle condizioni di ipertrofia (Shiojima I. et al., 2005). L'importanza di SDF invece risiede nel suo ruolo chemoattrattante; essa infatti favorisce l'homing e l'engraftment di cellule staminali. I cuori trattati con HBR risultano più ricchi in staminali autologhe, come dimostrano i nostri lavori precedenti (Lionetti V et al, 2010).

In ultimo abbiamo dimostrato come questi fenomeni siano probabilmente determinati da un effetto di HBR a livello trascrizionale, probabilmente grazie alla sua capacità di inibire le iston deacetilasi, favorendo la trascrizione di geni specifici. Il meccanismo con cui gli inibitori delle HDAC sopprimano l'ipertrofia cardiaca non è ancora del tutto chiarito. Difatti i substrati su cui le HDAC vanno ad agire sono sia la cromatina sia substrati non cromatinici. L'espressione genica non è aumentata in modo aspecifico, anzi al contrario l'azione di questi farmaci sembra altamente specifica, come mostrano anche gli studi con HBR. Gli inibitori delle HDAC sembrano bloccare la fibrosi grazie a diversi meccanismi. In primo luogo inibendo la proliferazione e la migrazione dei fibroblasti, inducendo geni in grado di sopprimere la sintesi di ECM e facendo diminuire l'infiammazione. Inoltre è stato dimostrato che essi sono in grado di inibire la transizione verso un fenotipo miofibroblastico, inibendo la sintesi asma. (Guo W, et al, 2009)

Il rimodellamento cardiaco dopo infarto coinvolge cambiamenti strutturali sia nella zona colpita che nelle zone lontane, in modo tempo-dipendente. Questi cambiamenti influiscono profondamente sull'organo, alterandone la funzione e la forma in modo profondo (Jugdutt B. 1993). I cambiamenti strutturali includono la distruzione della matrice extracellulare, la dilatazione del ventricolo sinistro, l'ipertrofia ventricolare sinistra e la formazione di aneurismi. Dopo l'infarto, la dilatazione dell'area infartuata contribuisce alla dilatazione regionale che precede la dilatazione globale. Infiammazione e riparo coinvolgono cambiamenti biochimici, molecolari e nella composizione cellulare in tutte le regioni del cuore. Infiammazione e riparo possono coinvolgere diversi tipi cellulari (cellule infiammatorie, cardiomiociti, fibroblasti, cellule vascolari), citochine, fattori di crescita, e molecole bioattive che agiscono a livello endocrino, paracrino e autocrino, tutto al fine di preservare la struttura e la funzione dell'organo. Anche le forze meccaniche che fanno aumentare lo stress murale determinano il rimodellamento. Gli interventi farmacologici modificano tutte queste componenti, al fine di limitare un rimodellamento che con il passare del tempo diventa patologico. Poiché i fibroblasti e la matrice extracellulare sono fondamentali nel rimodellamento post-infartuale, un'ipotesi particolarmente attraente è quella di intervenire su di essi al fine di migliorare il processo di cicatrizzazione impattando in modo significativo sull'architettura e sulla funzione. Queste terapie potrebbero essere definite "anti-rimodellamento" e potrebbero essere molto interessanti nell'ambito della prevenzione dello scompenso. Diversi farmaci sono in grado di limitare il rimodellamento cardiaco e di diminuire la fibrosi interstiziale e il contenuto generale di collagene. Lo sviluppo di agenti antifibrotici diretti a

target specifici per la sintesi e la degradazione del collagene rappresentano una strategia potenzialmente molto promettente.

In questo contesto HBR risulta una molecola di grande interesse, come hanno dimostrato i nostri dati in vitro ed in vivo.

6.- Bibliografia

- Armstrong EJ, Bischoff J. (2004) Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 95: 459–470
- Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, Figg WD (2005) Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol* 68:917–932
- Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, Hollingsworth LM, Zhang CL, Schreiber K, Rindt H, Gorczynski RJ, and Olson EN (2003) Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 278:28930–28937
- Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA (2007) Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(3):H1883-91
- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P (1994) Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 89(1):151-63
- Bosman FT, Stamenkovic I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200:423–428

- Cabrera S, Gaxiola M, Arreola JL, Ramírez R, Jara P, D'Armiento J, Richards T, Selman M, Pardo A. (2007) Overexpression of MMP9 in macrophages attenuates pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(12):2324-38
- Camelliti P, Borg TK, Kohl P. (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* Jan 1 65(1):40-52
- Catalano MG, Poli R, Pugliese M, Fortunati N, and Boccuzzi G (2007) Valproic acid enhances tubulin acetylation and apoptotic activity of paclitaxel on anaplastic thyroid cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer* 14:839 – 845
- Chaturvedi RR, Herron T, Simmons R, Shore D, Kumar P, Sethia B, Chua F, Vassiliadis E, Kentish JC (2010) Passive stiffness of myocardium from congenital heart disease and implications for diastole. *Circulation* 121:979–988
- Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH (2000) CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* Oct 32(10):1805-19
- Chintalgattu V, Nair DM, Katwa LC. (2003) Cardiac myofibroblasts: A novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* 35: 277–286
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, and Mann M (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325:834 – 840

- Cleutjens J.P., Blankesteyn W.M., Daemen M.J. & Smits J.F. (1999), The infarcted myocardium: simply dead tissue, or lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc. Res.* 44: 232-24
- Corda S, Samuel JL, Rappaport L. (2000) Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev* 5:119–130
- Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 48:509–517
- Eghbali M, Weber KT (1990) Collagen and the myocardium: Fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol Cell Biochem* 96:1–14
- Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, and Verdin E (2002) Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol Cell* 9:45–57
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol.* Sep 107(3):404-11
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, and Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15–23

- Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. (1998) Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 40:352–363
- Guo W, Shan B, Klingsberg RC, Qin X, Lasky JA (2009) Abrogation of TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast differentiation by histone deacetylase inhibition, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Nov 297(5):L864-70
- Harada K, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y, Komuro I. (1999) Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation*. Nov 16 100(20):2093-9
- Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C (2001a) Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 12:2730–2741
- Hinz B, Gabbiani G (2003b) Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 14:538–546
- Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G (2001b) Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159:1009–1020
- Hughes GC, Biswas SS, Yin B, Coleman RE, DeGrado TR, Landolfo CK, Lowe JE, Annex BH, Landolfo KP. (2004) Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg*. Mar 77(3):812-8

- Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino Ki, Ikeda E, Takata S, Kobayashi Ki, Okada Y (2002) Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J* 16:219–221
- Jugdutt BI (1993) Prevention of ventricular remodelling post myocardial infarction: timing and duration of therapy. *Can J Cardiol.* Jan-Feb 9(1):103-14
- Kai H, Mori T, Tokuda K, Takayama N, Tahara N, Takemiya K, Kudo H, Sugi Y, Fukui D, Yasukawa H, Kuwahara F, Imaizumi T (2006) Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II. *Hypertens Res* 29:711–718
- Kamkin A, Kiseleva I, Isenberg G, Wagner KD, Gunther J, Theres H, Scholz H. (2003) Cardiac fibroblasts and the mechano-electric feedback mechanism in healthy and diseased hearts. *Prog Biophys Mol Biol* 82: 111–120
- Kee HJ, Sohn IS, Nam KI, Park JE, Qian YR, Yin Z, Ahn Y, Jeong MH, Bang YJ, Kim N, et al. (2006) Inhibition of histone deacetylation blocks cardiac hypertrophy induced by angiotensin II infusion and aortic banding. *Circulation* 113:51–59
- Kohl P (2003) Heterogeneous cell coupling in the heart: An electrophysiological role for fibroblasts. *Circ Res* 93: 381–383
- Li GR, Sun HY, Chen JB, Zhou Y, Tse HF, Lau CP. (2009). Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS ONE* 4:e7307

- Lie-Venema H, van den Akker NM, Bax NA, Winter EM, Maas S, Kekarainen T, Hoeben RC, DeRuiter MC, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC (2007) Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal* 7: 1777–1798.
- Lionetti V, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Valente S, Frascari I, Olivi E, Aquaro GD, Bonavita F, Scarlata I, Maioli M, Vaccari V, Tassinari R, Bartoli A, Recchia FA, Pasquinelli G, Ventura C (2010) Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acid affording myocardial survival and repair without stem cell transplantation. *J Biol Chem*. Mar 26;285(13):9949-61.
- Miragoli M, Gaudesius G, Rohr S. (2006) Electronic modulation of cardiac impulse conduction by myofibroblasts. *Circ Res* 98:801–810.
- Norris RA, Borg TK, Butcher JT, Baudino TA, Banerjee I, Markwald RR. (2008) Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: Developmental role of periostin. *Ann N Y Acad Sci* 1123:30–40
- Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, Nakanishi T, Takeda K, Nakahama M, Doi M, Murakami T, Ninomiya Y, Takigawa M, Tsuji T (1998) Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*. Nov;30(11):2411-22
- Olivey HE, Mundell NA, Austin AF, Barnett JV (2006) Transforming growth factor-beta stimulates epithelial–mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* 235:50–59

- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR
Nucleic Acids Res. May 1 29(9) e45
- Rohr S (2004) Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. Cardiovasc Res 62:309–322
- Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh KJ (2005) Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. J Clin Invest. Aug;115(8):2108-18
- Souders CA, Bowers SL, Baudino TA (2009). Cardiac fibroblast: The renaissance cell. Circ Res 105: 1164–1176
- Spach MS, Boineau JP. (1997). Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: A major mechanism of structural heart disease arrhythmias. Pacing Clin Electrophysiol 20:397–413
- Sucov HM, Dyson E, gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM (1994) RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. 994 May 1 8(9):1007-18
- Sun Y., Klani M.F., Postlethwaite A.E., Weber K.T (2002). Infarct scar as living tissue. Basic Res.Cardiol. 97, 343-347

- Tammi R, Rilla K, Pienimäki JP, MacCallum DK, Hogg M, Luukkonen M, Hascall VC, Tammi M. (2001) Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem.* Sep 14 276(37):35111-22
- Tsuruda T, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC, Jr. (2004). Matrix metalloproteinases: Pathways of induction by bioactive molecules. *Heart Fail Rev* 9:53–61
- van den Borne SW, Isobe S, Verjans JW, Petrov A, Lovhaug D, Li P, Zandbergen HR, Ni Y, Frederik P, Zhou J, Arbo B, Rogstad A, Cuthbertson A, Chettibi S, Reutelingsperger C, Blankesteyn WM, Smits JF, Daemen MJ, Zannad F, Vannan MA, Narula N, Pitt B, Hofstra L, Narula J. (2008) Molecular imaging of interstitial alterations in remodeling myocardium after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* Dec 9 52(24):2017-28
- Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. (2007), Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* May 11 282(19):14243-52.
- Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. (2007) Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J Biol Chem.* May 11 282(19):14243-52.
- Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A. (2004) Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a

high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells; *J Biol Chem.* May 28 279(22):23574-9

- Ventura, C., Maioli, M., Asara, Y., Santoni, D., Scarlata, I., Cantoni, S., and Perbellini, A. (2004) Butyric and Retinoic Mixed Ester of Hyaluronan *J. Biol. Chem.* 279, 23574-23579
- Vliegen HW, van der LA, Cornelisse CJ, Eulderink F (1991) Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* 12:488–494
- Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI (1988) Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res.* Apr 62(4):757-65
- Weber KT, Sun Y, Katwa LC (1997) Myofibroblasts and local angiotensin II in rat cardiac tissue repair. *Int J Biochem Cell Biol.* Jan 29(1):31-42
- Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83:835–870
- Wheatley SC, Isacke CM, Crossley PH. (1993) Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development.* Oct 119(2):295-306
- Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM (1997) Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived

cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes., *J Mol Cell Cardiol.* Jun 29(6):1525-39

- Wynn T.A. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *J. Pathol.* 214, 199-210
- Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J (2003) CHARM Investigators and Committees. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet.* Sep 6 362(9386):777-81
- Zhou B, von GA, Ma Q, Hu YW, Pu WT (2010) Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosus of the mammalian heart. *Dev Biol* 338:251–261

