

Università degli Studi di Firenze
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Anatomia Istologia e Medicina Legale
Sezione di Istologia “E.Allara”

Scuola di dottorato: Scienze e Tecnologie Biomolecolari
e Morfologiche

Dottorato di ricerca in
Morfologia e Morfogenesi Umana
XIII Ciclo
(BIO/17)

**EFFETTI BIOLOGICI
E POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE
DELL'ORMONE RELASSINA
E DI NUOVI AGONISTI RELASSINICI**

Dott. Alessandro Pini

Tutor
Prof. Daniele Bani

Coordinatore
Prof.ssa Sandra Zecchi

Anno Accademico 2010-2011

Indice

- **Introduzione generale** pag.1

- **Applicazione della Relassina alla cardiomioplastica**
 - Materiali e Metodi pag.34
 - Risultati pag.41
 - Discussione pag.52

- **Ruolo della Relassina nel differenziamento cardiomiocitario**
 - Materiali e Metodi pag.57
 - Risultati pag.65
 - Discussione pag.76

- **Attività biologica dell'agonista della Relassina CGEN25009 nella fibrosi polmonare**
 - Introduzione pag.81
 - Materiali e Metodi pag.83
 - Risultati pag.92
 - Discussione pag.105

- **Bibliografia** pag.109

La Relassina

La rilassina (RLX) è un ormone peptidico prodotto principalmente dal corpo luteo, dall'utero e dalla placenta durante la gravidanza. La sua funzione primaria è facilitare il parto, favorendo il rilassamento dei tessuti del canale del parto e l'allungamento del legamento interpubico. La scoperta dell'ormone rilassina risale alla seconda metà degli anni venti.

Storia

Nel 1926 Frederick Hisaw osservò l'allungamento del legamento interpubico in cavie non gravide, iniettate con siero di cavia gravida. (Hisaw, 1926)

Quattro anni più tardi, Hisaw ed i suoi collaboratori riuscirono a ricavare dal corpo luteo di scrofa gravida un estratto acquoso non puro, da cui fu poi concentrato un peptide con caratteristiche chimiche di ormone, capace di determinare l'allungamento del legamento interpubico. Questa nuova sostanza fu chiamata rilassina, proprio in virtù dell'effetto biologico osservato. (Fevold et al., 1930).

Negli anni '30 del secolo scorso, furono effettuati da Fevold e collaboratori i primi tentativi di estrazione della rilassina da corpo luteo di scrofe gravide, sfruttandone la diversa solubilità nelle sostanze, ma ottenendo solo scarse quantità di proteina a basso grado di purificazione.

Negli anni '70, l'avvento di nuove tecniche basate sulla cromatografia a scambio ionico e sulla cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) hanno permesso di ottenere preparazioni di relassina da corpo luteo in varie specie animali (compreso l'uomo) con un discreto livello di purezza.

Nel 1974 Sherwood e O'Byrne riuscirono a purificare grandi quantità di relassina porcina da ovaie di scrofa gravida (*Sus scrofa*), con un metodo basato sulla diversa solubilità dell'ormone in solventi acidi ed acetone. La molecola era purificata mediante cromatografia a scambio ionico, ottenendo un eluato con tre picchi contigui; successivamente, Walsh e Niall riuscirono ad ottenere un eluato con un solo picco (Walsh e Niall, 1980).

Anche nell'uomo è stata tentata la purificazione dell'ormone da tessuti dell'apparato riproduttore, senza però ottenere buoni risultati, sia a causa della scarsità di tessuto disponibile, sia per la minor quantità fisiologicamente prodotta nell'uomo rispetto ad altre specie. Negli anni '90 venne infatti estratta e misurata da Drolet e Winslow la relassina ottenuta dal corpo luteo di donne, asportato chirurgicamente a causa di gravidanza ectopica. L'estrazione avvenne sfruttando la solubilità della proteina in acetone e la sua purificazione sfruttando più tecniche in contemporanea: filtrazione su gel, cromatografia di affinità e HPLC.

Attualmente, il metodo maggiormente accreditato per la produzione di relassina umana sfrutta la tecnica del DNA ricombinante (Stults et al., 1990).

Per la valutazione della purezza del preparato, sono stati messi a punto saggi di attività biologica, che si basano sulla risposta di determinati tipi cellulari allo stimolo con concentrazioni crescenti di relassina; ne è un esempio il test di attività biologica basato sull'inibizione dell'aggregazione piastrinica (Bani et al., 2007).

Storicamente la relaxina è stata classificata come un ormone pertinente alla sola sfera riproduttiva, in quanto capace di indurre, attraverso il rimodellamento del collagene, cambiamenti nel tessuto connettivo cervicale, favorendone la maturazione prima del parto (Sherwood, 2006).

Negli ultimi trenta anni si è invece dimostrato che la relaxina svolge un'azione pleiotropica, influenzando ad esempio il turnover del collagene anche in distretti diversi da quello legato alla riproduzione, quali l'epidermide (Unemori and Amento, 1990), il polmone (Unemori et al., 1996), il rene (Garber et al., 2001), il fegato (Williams et al., 2001) ed il cuore (Samuel et al, 2004; Lekgabe et al., 2005; Perna et al., 2005); è implicata nella regolazione dei processi infiammatori (Masini et al., 1994; Masini et al., 2004) ed è ormai accreditata come ormone cardiotropico (Bani et al., 1997).

Genetica

La famiglia della relaxina consta nell'uomo di 3 isoforme di relaxina, codificate dai geni *RLN1*, *RLN2*, *RLN3* e di 4 isoforme di proteine insulin-like, codificate dai geni *INSL3*, *INSL4*, *INSL5*, *INSL6*. In numerose specie, come ad esempio nel topo, i geni per la RLX sono soltanto due, *RLN1* (corrispondente a *RLN2* nell'uomo) e *RLN3* (corrispondente a *RLN-3* nell'uomo).

Nell'uomo, i geni *RLN1* e *RLN2* sono localizzati sul cromosoma 9, in stretta vicinanza ad i geni *INSL4* e *INSL6*, mentre *RLN3* mappa sul cromosoma 19, vicino ad *INSL3*; *INSL5* mappa sul cromosoma 1 (Bathgate et al., 2002; Hsu et al., 2003). Nel topo invece, *RLN1* è

localizzato sul cromosoma 19, in prossimità di *INSL6*, mentre *RLN3* mappa sul cromosoma 8, vicino a *INSL3*. I prodotti dei geni umani *RLN1*, *RLN2* e *RLN3* sono chiamati rispettivamente relassina H1, relassina H2 e relassina H3, mentre i prodotti dei geni murini e del ratto *RLN1* e *RLN3* sono chiamati relassina e relassina 3 (Bathgate et al., 2006).

Struttura

La relassina è un ormone polipeptidico di 6KDa con struttura simile all'insulina, con cui condivide infatti peso molecolare, numero di catene da cui è formata, loro lunghezza e ponti di-solfuro (Bathgate et al., 2006).

Come l'insulina, la relassina è formata da due catene, A e B (Fig.1); la catena A consta di 24 residui aminoacidici (25 nel topo) con 2 strutture ad α -elica in posizione A3-9 ed A13-20, mentre la catena B è costituita da 29 residui aminoacidici con una sola struttura ad α -elica in posizione B7-22. Le catene sono legate covalentemente da due ponti disolfuro e un ponte disolfuro intracatena (nella catena A) stabilizza la struttura terziaria (Bathgate et al., 2006). Poiché le glicine in posizione B8 e B20 e metà delle cisteine necessarie per la formazione dei ponti disolfuro sono essenziali per il corretto folding "insulin-like", risulta chiaro come la relassina e l'insulina condividano un'analogia struttura (Bathgate et al., 2006).

La relassina mantiene nelle diverse specie una scarsa omologia della sequenza aminoacidica, compresa tra il 30% ed il 60%. A questo si contrappone una conservata localizzazione dei ponti disolfuro e delle

cisteine, che sembrano indicare una struttura terziaria simile per tutte le isoforme (Bryant-Greenwood et al., 1994).

L'analisi a livello molecolare, effettuata tramite sostituzione puntiforme nella struttura peptidica, ha portato ad individuare i

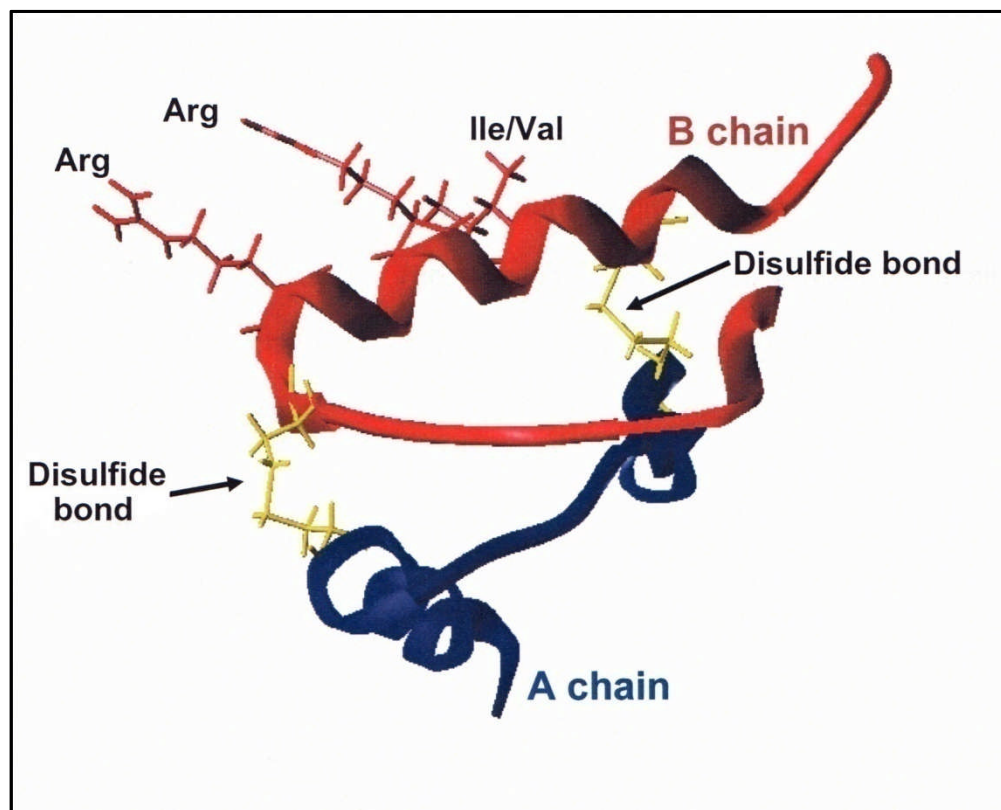


Fig.1 Struttura della relassina (Sherwood, *Endocr Rev* 25:205–34, 2004)

residui aminoacidici della relassina conservati durante l'evoluzione: nella catena A si mantengono costanti le cisteine in posizione A10, A11, A15, la glicina in A14, le lisine in A9 e A17 e le arginine in A18 e

A22, mentre nella catena B, le glicine in B12 e B14 e le arginine B13 e B17.

Mediante l'impiego dell'anticorpo specifico R6, diretto contro le arginine B13 e B17, è stato dimostrato che questi due residui si trovano nei pressi dei ponti di-zolfo e svolgono un ruolo fondamentale per la bioattività, in quanto implicati nel legame ligando-recettore (Bullesbach e Schwabe, 2005); anche minime loro variazioni determinano il mancato legame con il recettore.

Sintesi

La relassina, come anche l'insulina, viene sintetizzata sottoforma di precursore, noto come pre-pro-relassina. Ha un peso molecolare di 23 KDa ed è costituito da una singola catena, che comprende il peptide segnale, la catena B, il peptide di connessione C e la catena A.

Il processo di maturazione inizia ad opera di enzimi di membrana del reticolo endoplasmatico ruvido, che effettuano un taglio del peptide segnale (3KDa) a livello della estremità carbossiterminale della catena B, su residui aminoacidici con catena laterale corta come la leucina 32. Da questo taglio si ottiene la pro-relassina.

La completa maturazione avviene presumibilmente nei vacuoli di secrezione gemmati dal Golgi: i pro-ormone convertasi PC-1 e PC-2, coinvolti anche nella sintesi della insulina dalla pro-insulina, effettuano il taglio tra il peptide C e l'estremità carbossiterminale della catena A, mentre PC-3 determina il taglio tra il peptide C e la catena B (Smeekens et al., 1992). Esiste soltanto un lavoro che

indica la PC-1, piuttosto che la PC-2, esser l'enzima coinvolto nella sintesi della relassina matura (Marriott et al., 1992).

Il peptide C potrebbe esser legato al folding della proteina, in quanto sembra dirigere la corretta formazione dei ponti disolfuro tra la catena A e la catena B.

La pre-pro-relassina è priva di attività biologica, mentre la pro-relassina, sebbene dotata ancora del peptide C, ha un'attività biologica paragonabile a quella della molecola matura (Zarre et al., 2001).

Localizzazione

APPARATO RIPRODUTTIVO FEMMINILE

L'espressione della relassina H1 è limitata alla decidua ed alla placenta, sebbene il ruolo biologico di questa isoforma rimanga ancora sconosciuto. La relassina H2 nell'uomo e la relassina nel topo e nel ratto sono prodotte ad alti livelli durante la gravidanza dalla placenta, dall'utero e soprattutto dal corpo luteo, che ne rappresenta la fonte primaria nelle diverse specie animali (Skott e Carter, 2002; Sherwood, 2004; Bathgate et al., 2002; Samuel et al., 2003). Le fonti secondarie di relassina H2 sono la ghiandola mammaria e le tube di falloppio (Bryant-Greenwood et al., 1987; Mazoujian e Bryant-Greenwood, 1990), mentre nel topo è la ghiandola mammaria (Peaker et al., 1989) e nel ratto sono l'utero, la placenta e la ghiandola mammaria (Gunnensen et al., 1995).

La relaxina 3 nel topo è prodotta dalle cellule luteali ed è espressa anche nell'ovaio del topo, sebbene le due forme sembrano non essere identiche (Bathgate et al., 2002).

APPARATO RIPRODUTTIVO MASCHILE

L'espressione della relaxina H1 è limitata alla prostata, sebbene il suo ruolo biologico rimanga ancora sconosciuto; piccole quantità si ritrovano nel fluido seminale. L'espressione della relaxina H2 e del suo mRNA è stata dimostrata nella prostata e nelle vescichette seminali (Gunnarsen et al., 1996, Yki-Jarvinen et al., 1983); nel topo (Samuel et al., 2003) e nel ratto (Gunnarsen et al., 1995) la relaxina è espressa nei testicoli e nella prostata. Nell'uomo è stata anche dimostrata l'espressione della relaxina H3 a livello dei testicoli, ma ne rimane ancora sconosciuto il ruolo biologico (Liu et al., 2003).

ORGANI NON RIPRODUTTIVI

La relaxina è espressa anche al di fuori degli organi riproduttivi. Mediante RT-PCR è stato dimostrato che, sia nella porzione atriale che in quella ventricolare del cuore umano, sono espresse piccole quantità di relaxina H1 e H2 e che tale espressione aumenta in pazienti con deficit cardiaco (Dschietzig et al., 2001).

Nel topo invece la relaxina è presente a livello di mRNA nell'encefalo, nel polmone, nel rene, nel fegato, nel timo, nella milza e nel cuore (Bathgate et al., 2002; Du et al., 2003; Samuel et al., 2004); nel ratto è invece presente nel cuore, nell'encefalo, nel rene, nel pancreas e nel fegato (Osheroff e Ho, 1993; Gunnarsen et al., 1995).

L'espressione della relaxina 3 nell'uomo è localizzata essenzialmente a livello encefalico, ma è stata dimostrata anche nei linfonodi, nella milza e nel timo (Bathgate et al., 2002); nel topo invece si trova nell'encefalo (Bathgate et al., 2002), nella milza, nel timo, nel polmone, cuore, rene e fegato (Bathgate et al., 2002; Samuel et al., 2003; Samuel et al., 2004); nel ratto è invece presente nell'encefalo e nel cuore (Kompa et al., 2002; Samuel et al., 2004).

Recettori

Per numerosi anni i ricercatori hanno tentato di identificare i recettori per la relaxina, tuttavia la somiglianza strutturale tra quest'ormone e l'insulina aveva fatto pensare che le due molecole condividessero i medesimi recettori con attività tirosina-chinasica. Nel 2002 è stato invece scoperto che la relaxina è capace di attivare due recettori, fino ad allora orfani ed appartenenti alla famiglia LGRs, LGR7 ed LGR8 (leucine rich repeat-containing G protein-coupled receptors) (Hsu et al., 2002; Rosenkranz et al., 2002). Tali recettori sono stati rinominati rispettivamente RXFP1 e RXFP2 (Relaxin Family Peptide Receptors) (Bathgate et al., 2006). Una ulteriore conferma all'importante scoperta, deriva dal fatto che inibitori dell'attivazione delle proteine G aboliscono la risposta delle cellule bersaglio alla relaxina (Barstch et al., 2001).

Successivamente sono stati individuati altri due recettori accoppiati a proteine G, a cui la relaxina è in grado di legarsi: GPCR135 e GPCR142 (Liu et al., 2003), rispettivamente rinominati RXFP3 e RXFP4.

RXFP1 e RXFP2

Il recettore RXFP1 è costituito nella sua porzione N-terminale da una lipoproteina a bassa densità di classe A (LDLa), seguita da 2 regioni ricche in cisteine, tra loro separate da una ripetizione multipla di leucine (Multiple leucine-rich repeats LRR). L'ectodominio è connesso ad una regione formata da sette domini trans-membrana, a cui segue la porzione C-terminale (Fig.2). Eventi di splicing alternativo sulla regione che codifica per l'ectodominio generano le isoforme del recettore (Bathgate et al., 2006). RXFP1 e RXFP2 condividono circa il 60% dei 700 residui aminoacidici di cui sono composti e possiedono entrambi nel dominio extracellulare 10 LRRs e la lipoproteina a bassa densità di classe A.

Sfruttando varianti chimeriche dei recettori RXFP1 e RXFP2, sono stati individuati due siti di legame per la relassina: uno a maggiore affinità nella regione extracellulare, l'altro a bassa affinità, posto a livello del dominio trans-membrana. Il legame recettore-ligando avviene attraverso la chelazione sincronizzata delle due arginine B13 e B17 presenti sulla relassina, ad opera di una coppia di acido aspartico e acido glutammico del recettore. Tale legame è stabilizzato dalla interazione idrofobica che la isoleucina B20 dell'ormone stabilisce con i residui di triptofano, isoleucina e leucina dei domini LRR sul recettore (Büllesbach et al., 2005). Il recettore, una volta avvenuto il legame con la relassina, va incontro ad un cambiamento conformazionale che favorisce il contatto del ligando con i domini transmembrana. Questa nuova conformazione determina, attraverso il dominio LDLa, l'attivazione della proteina adenilato ciclasi (AC) e conseguente produzione di AMP ciclico (cAMP) (Scott et al., 2006). RXFP1 è il recettore principale ed il più specifico per la relassina H2, tuttavia lega anche la relassina H3; è espresso sia nell'apparato

riproduttivo durante la gravidanza, sia nell'encefalo, rene, cuore e polmone (Bathgate et al., 2003).

RXFP2 invece lega il peptide INSL3, ma è capace di legare con minore affinità anche la relassina H1 e H3 (Hsu et al 2002; Sudo et al., 2003).

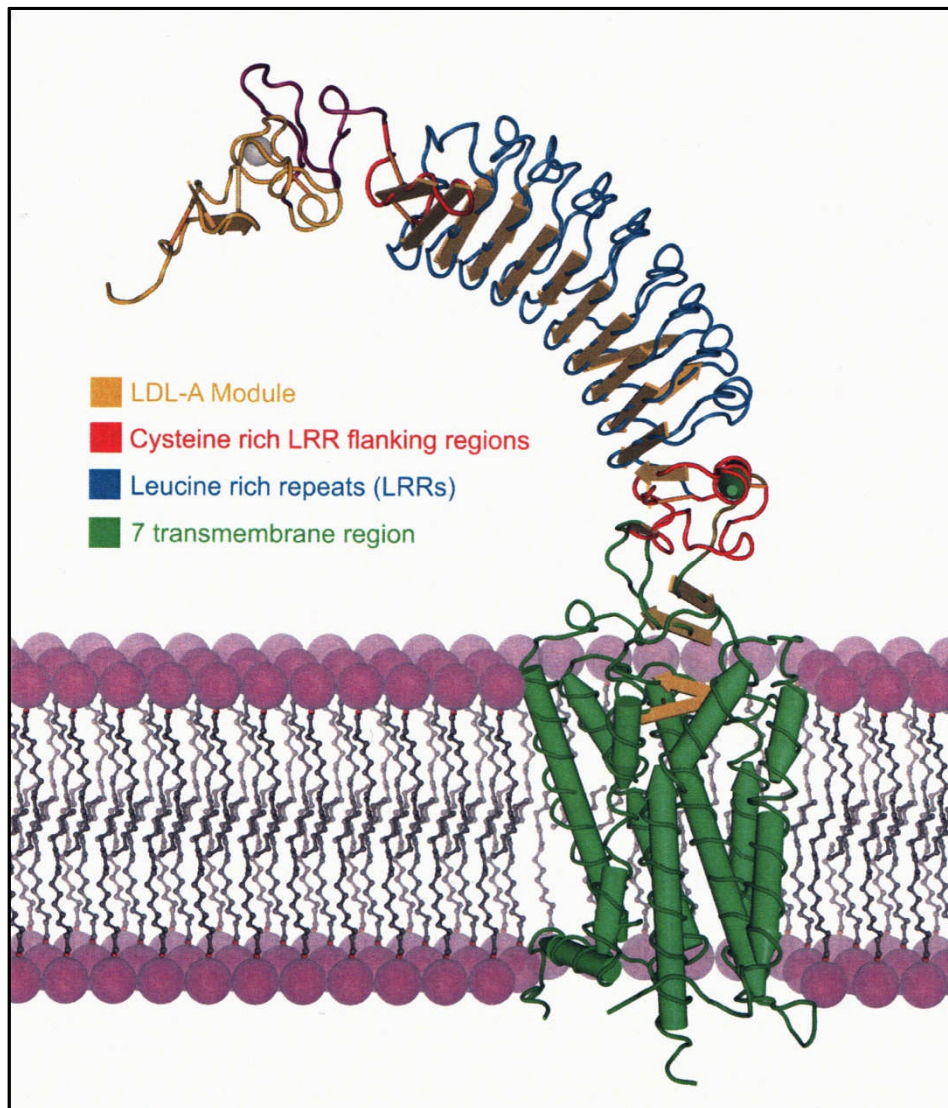


Fig.2 Modello strutturale del recettore RXFP1

RXFP3 E RXFP4

La relassina 3 è considerata il ligando per i due recettori orfani RXFP3 e RXFP4 (Liu et al., 2003).

RXFP3 è altamente espresso nell'encefalo del ratto (McGowan et al., 2006) e rappresenta il recettore endogeno per la relassina 3.

RXFP4 è selettivamente attivato dalla relassina 3, seppur a bassa affinità, ed è stato localizzato in vari tessuti, quali cervello, rene, testicolo, timo, placenta, prostata, ghiandola salivari, tiroide e colon (Liu et al., 2003); recentemente è stato scoperto che rappresenta il recettore endogeno per ISLN5 (Liu et al., 2003).

Meccanismi di trasduzione del segnale

PRODUZIONE DI cAMP

Nelle linee cellulari THP-1 (Human Acute Monocytic Leukemia) e HEK293T (Human Embryonic Kidney) è stato dimostrato che il legame della relassina al recettore RXFP1 determina due meccanismi di risposta successivi nel tempo: durante i primi 1-2 minuti, attraverso la subunità α della proteina G_s , si ha l'attivazione della AC, con conseguente incremento intracellulare dei livelli di cAMP. Il successivo meccanismo a 10-20 minuti dalla stimolazione prevede invece l'attivazione della fosfatidil-inositolo3 chinasi (PI3K), mediata dalla subunità $\beta\gamma$ della proteina G_i . La produzione di fosfatidil-inositolo-3-fosfato da parte della PI3K determina una traslocazione in membrana della proteina-chinasi $C\zeta$, che fosforila AC, incrementando il livello intracellulare di cAMP (Nguyen e Dessaur, 2005).

La via di trasduzione del segnale che coinvolge PI3K potrebbe essere innescata anche attraverso tirosine-chinasi, attivate dagli stessi recettori RXFP1 (Bartsch et al., 2001) (Fig.3).

PRODUZIONE DI NO

La relassina è inoltre capace di incrementare i livelli di produzione di NO, modulando l'attivazione e l'espressione delle proteine NO sintasi II (NOS-II) e della NO sintasi III (NOS-III). Il sistema di trasduzione del segnalazione coinvolge PI3K, attraverso cui si attiva la proteina chinasi B che, mediante fosforilazione sul residuo di serina 1179, attiva a sua volta la NOS III.

Un meccanismo alternativo si basa invece sull'aumento di espressione di cAMP, con conseguente attivazione della proteina chinasi A, che fosforila ed inattiva I κ B- α , subunità inibitoria del fattore di trascrizione kB. Quest'ultimo può così traslocare nel nucleo e promuovere l'espressione della NOS II (Nistri et al., 2003).

Nonostante numerosi studi al riguardo, i meccanismi di trasduzione del segnale della relassina rimangono ancora incompleti e non del tutto chiariti. Dschietzig ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che nelle cellule THP-1 la relassina H1 e H2 è capace di legare ed attivare i recettori per i glucocorticoidi (GR) (Dschietzig et al., 2005), con conseguente diminuzione della produzione di mediatori infiammatori (IL-1, IL-6 e TNF- α) (Fig.3).

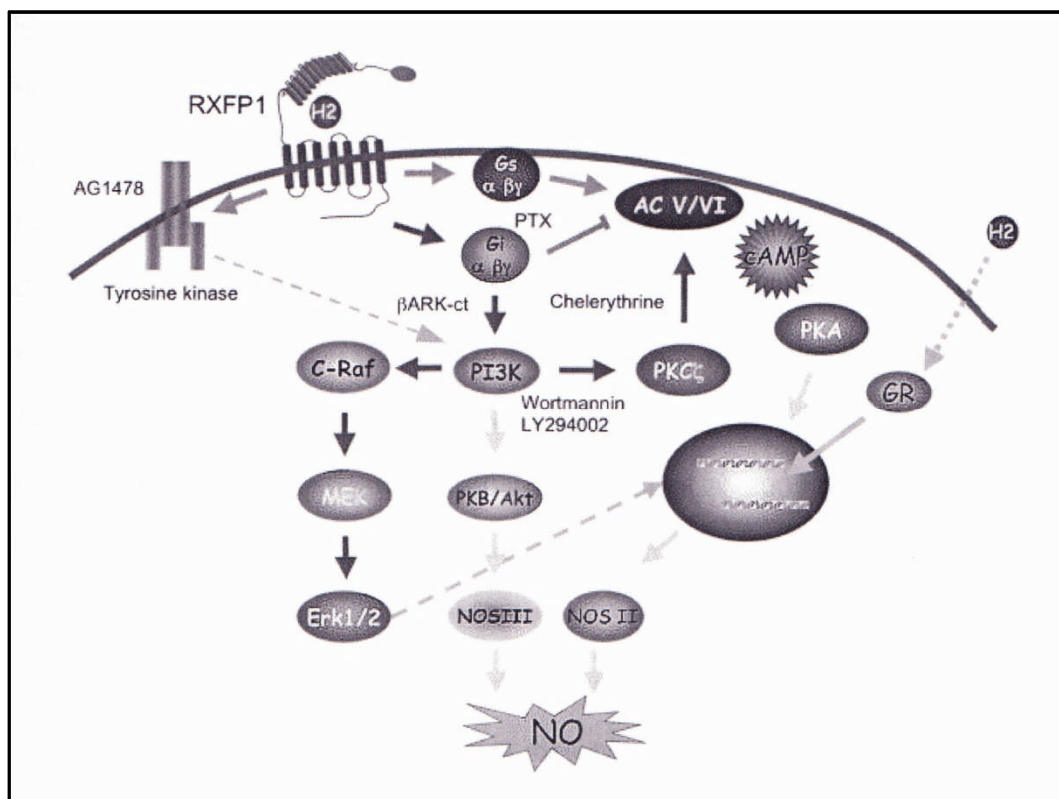


Fig.3 RXFP1, modello di trasduzione del segnale

Effetti protettivi della relassina

Studi *in vivo*, effettuati sui roditori mediante anticorpi che neutralizzano la relassina (MCA1), hanno dimostrato come questa sia capace di svolgere una funzione trofica per gli organi riproduttivi femminili e l'apparato mammario (necessari per il parto e l'allattamento). I ratti immunizzati con MCA1 mostrano infatti sia un compromesso sviluppo del capezzolo (Kuenzi e Sherwood, 1992) che un sottosviluppo della vagina e della cervice uterina, con alta densità di fasci di fibre collagene e minore irrorazione dello stroma (Zhao e

Sherwood, 1998). I ratti immunizzati sono anche soggetti a parti non vitali ed i cuccioli hanno dimensioni minori rispetto ai relativi controlli (Guico-Lamm e Sherwood, 1988).

Il minor sviluppo degli organi sembra imputabile ad un accumulo di collagene ed a un suo diminuito rimodellamento, normalmente mediato dalla relassina (Zhao et al., 1999).

L'impiego di topi knockout per la relassina (RLX -/-) ha permesso di confermare i risultati ottenuti con gli anticorpi MCA1, avvalorando quindi il concetto che la relassina è necessaria per il rilassamento del canale del parto, per l'inibizione dell'attività contrattile dell'utero, per la crescita ed il differenziamento della ghiandola mammaria e la maturazione della cervice uterina (Skott e Carter, 2002).

Anche i topi RLX -/- maschi mostrano un sottosviluppo degli organi sessuali: inadeguata dimensione della prostata, dei testicoli e dell'epididimo (Samuel et al., 2003).

Effetti biologici della relassina esogena

RIMODELLAMENTO DEL COLLAGENE

Nei primi anni ottanta, Too e collaboratori, mediante esperimenti condotti *in vitro* su cellule della granulosa di ratto, hanno osservato che la relassina stimola il rilascio di attivatore del plasminogeno, degli enzimi metallo-proteasi della matrice (MMPs) e di proteoglicanasi (Too et al., 1984). In studi effettuati *in vivo* su ratti femmina, è stato evidenziato che il trattamento con relassina porcina diminuisce la quantità di collagene presente nella cervice uterina e ne aumenta la solubilità (Downing e Sherwood, 1986). Ulteriori

studi, realizzati su colture di fibroblasti provenienti da derma umano, hanno dimostrato che la relaxina, incrementando l'espressione degli MMPs, down-regola la produzione degli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMP) e la secrezione di collagene (Unemori e Amento, 1990). In questo stesso modello, la relaxina è in grado inoltre di inibire la produzione di collagene stimolata dal TGF- β (Unemori e Amento, 1990).

Attraverso esperimenti *in vitro* su colture di fibroblasti derivanti da cervice uterina umana, è stato dimostrato che la relaxina determina un aumento di espressione di specifiche metallo-proteasi della matrice: MMP-1 (collagenasi), MMP-2 (gelatinasi) e MMP-3 (stromelisina) (Palejwala et al., 2001).

La relaxina quindi, attraverso la modulazione dell'espressione di MMPs e TIMP e la regolazione della secrezione del collagene, ne promuove il rimodellamento, non soltanto nell'apparato riproduttivo femminile, ma anche in altri distretti, quali cuore, polmone, rene, fegato ed epidermide, e contrasta così il processo di formazione della fibrosi (Unemori e Amento, 1990, Unemori et al., 1996; Du et al., 2003; Garber et al., 2003; Samuel et al., 2003)

La fibrosi è l'end-point comune di svariate patologie, che colpiscono la maggior parte degli organi presenti nel corpo. E' caratterizzata da un accumulo di tessuto connettivo, che deriva dalla proliferazione e dal differenziamento dei fibroblasti ed una conseguente over-espressione di molecole della matrice extra-cellulare, in particolare del collagene (Bathgate et al., 2003). Un altro meccanismo che sostiene la fibrosi è lo squilibrio che si crea tra l'ipo-espressione degli enzimi che degradano il collagene (MMPs) e la iper-espressione dei loro inibitori (TIMPs) (Bathgate et al., 2003). L'incremento della deposizione di matrice extracellulare determina uno sconvolgimento

della fisiologica architettura tissutale dell'organo coinvolto con sua conseguente disfunzione (Bathgate et al., 2003).

E' stato dimostrato che la relassina H2 ricombinante diminuisce l'accumulo di collagene in due diversi modelli di fibrosi del derma, uno indotto nel ratto mediante inserimento di micro spugne imbevute di polivinil alcol, l'altro ottenuto nel topo con formazione di capsule connettivali attorno a pompe osmotiche impiantate (Unemori et al., 1993).

A livello polmonare, in un modello murino di fibrosi indotta da bleomicina, la somministrazione per 14 giorni di relassina H2 mediante pompe osmotiche diminuisce la quantità di collagene deposto e restituisce ai polmoni la normale funzionalità (Unemori et al., 1996).

E' stato inoltre dimostrato che il trattamento con relassina H2 diminuisce la deposizione di collagene sia *in vitro* da parte delle cellule stellate epatiche, sia *in vivo* in un modello di fibrosi epatica ottenuta nel ratto con somministrazione di carbonato tetra-clorato (Williams et al., 2001).

A livello renale, tramite esperimenti *in vivo* condotti su un modello di fibrosi interstiziale indotta da bromoetilamina nel ratto, è stato dimostrato che la relassina H2 svolge un'azione anti-fibrotica, che si traduce in un aumento della capacità di filtrazione glomerulare (Garber et al., 2001). In colture di fibroblasti renali umani, la relassina inibisce l'attivazione dei fibroblasti stessi e promuove la secrezione di MMP-2 e MMP-9 (Hegg et al., 2005). La relassina esplica inoltre la sua azione anti-fibrotica promuovendo la degradazione della fibronectina (costituente della matrice extracellulare) da parte della proteina ubiquitina (McDonald et al., 2003).

In un modello *in vivo* di fibrosi renale e cardiaca ottenuto in ratti con ipertensione spontanea è stato dimostrato che la relassina normalizza il contenuto di collagene sia nel cuore che nel rene ed inoltre inibisce la proliferazione ed il differenziamento dei fibroblasti (Lekgabe et al., 2005).

Il trattamento con relassina H2 in colture di fibroblasti cardiaci di ratto determina una variazione dei parametri fibrotici, tra cui un decremento della produzione di collagene di tipo I e di tipo III, una inibizione della specializzazione dei fibroblasti in miofibroblasti, una diminuzione della proliferazione cellulare ed un incremento della secrezione di MMPs (Samuel et al., 2004). L'ormone è inoltre capace di contrastare le attività pro-proliferativa e pro-differenziante indotte dal TGF- β e dall'angiotensina II su fibroblasti cardiaci in coltura (Samuel et al., 2004).

La relassina si è anche dimostrata efficace nel trattamento della fibrosi cardiaca indotta sperimentalmente. In un modello di danno ischemico nel cuore di ratto, ottenuto per sovraccarico funzionale tramite isoproterenolo, Zhang e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con relassina 3 diminuisce l'accumulo di collagene interstiziale e l'ipertrofia cardiaca (Zhang et al., 2005). In uno studio innovativo, effettuato su un modello di fibrosi cardiaca in ratti transgenici iper-esprimenti il recettore adrenergico β_2 , il trattamento con adenovirus ingegnerizzati per la produzione di relassina determina un significativo decremento di collagene interstiziale nel ventricolo sinistro, senza effetti collaterali nelle altre camere del cuore (non fibrotiche) (Bathgate et al., 2008). In un modello sperimentale di cardiomiopatia da diabete indotta su ratto e caratterizzata da accumulo di collagene nel ventricolo sinistro e da attivazione di miofibroblasti, il trattamento con relassina H2 promuove un miglioramento di entrambe le condizioni ed una

aumentata degradazione della matrice da parte di MMPs (Samuel et al., 2008)

L'importanza della relassina nel controllo della quantità di collagene presente negli organi è stata provata anche mediante l'impiego di topi knockout per la relassina (RLX^{-/-}). Questi animali dimostrano una progressione della fibrosi legata all'età a carico di numerosi organi: polmone, cuore, reni e epidermide; tale fibrosi sembra essere dovuta soprattutto all'accumulo di collagene di tipo I e III (Samuel et al., 2005).

Topi RLX^{-/-} di 9 mesi mostrano infatti fibrosi polmonare maggiormente consistente rispetto ai controlli, associata a congestione alveolare ed ispessimento dell'epitelio dei bronchi (Samuel et al., 2005); a livello cardiaco (nei topi maschi), è presente ipertrofia atriale e resistenza al riempimento diastolico ventricolare (Du et al., 2003; Samuel et al., 2004). In topi RLX^{-/-} maschi di 6 mesi il rene aumenta di dimensioni rispetto ai controlli, si ha ispessimento corticale, fibrosi interstiziale focale, aumento della creatinina plasmatica e deficit funzionale (Samuel et al., 2004).

Il trattamento di questi animali con relassina H₂ comporta una riduzione della deposizione e dell'accumulo di fibre collagene, con conseguente miglioramento della funzionalità degli organi coinvolti dalla fibrosi.

Gli esperimenti effettuati con topi knockout per il recettore (RXFP1^{-/-}) hanno riprodotto fedelmente i dati ottenuti con topi knockout per la relassina, confermando così il ruolo di protezione che la relassina svolge nell'invecchiamento degli organi (Kamat et al., 2004).

Le proprietà anti-fibrotiche della relassina hanno suscitato l'interesse dei clinici alla ricerca di fattori con cui modulare la deposizione patologica di collagene nelle malattie caratterizzate da sclerosi.

A questo proposito, Seibold e collaboratori hanno pubblicato uno studio relativo ad un *trial* clinico effettuato in doppio cieco su una coorte di 68 pazienti con sclerodermia di grado medio-grave, per la quale non esiste una terapia di provata efficacia. Il trattamento dei pazienti con relassina H2 per 24 settimane mediante pompe osmotiche si associa ad un ridotto ispessimento cutaneo, seppur non determini un miglioramento significativo della motilità fisica o della funzionalità polmonare dei pazienti (Seibold et al., 2000). Non si può tuttavia escludere che l'inefficacia terapeutica sia legata ad un protocollo di somministrazione non perfettamente adeguato e/o alla scelta di includere nello studio anche pazienti con patologia in stadio molto avanzato.

Una ulteriore applicazione della relassina potrebbe avvenire in campo odontoiatrico, in quanto sembra avere la capacità di modificare le caratteristiche fisiche del tessuto connettivo a livello delle gengive e del ligamento periodontale. Recenti studi effettuati nel topo hanno dimostrato come la relassina, identificata all'interno delle suture craniali, possa modulare il rimodellamento del tessuto connettivo nelle suture craniofaciali e nei tessuti periodontali (Nicozisis et al., 2000).

RUOLO DELLA RELASSINA NEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE

La relassina è stata storicamente classificata come un ormone pertinente alla sola sfera riproduttiva, tuttavia negli ultimi trenta anni si è invece dimostrato che svolge un'azione pleiotropica, esercitando un ruolo importante anche a livello del sistema cardiovascolare (SCV). La relassina agisce infatti su cuore, vasi sanguigni (arteriosi, capillari e venosi) ed elementi figurati del sangue, quali piastrine e leucociti.

VASI SANGUIGNI

La somministrazione locale o sistemica di relassina produce un'immediata vasodilatazione dei componenti del microcircolo, associata ad una maggiore irrorazione degli organi. Questo effetto vasodilatatore è stato osservato per la prima volta negli anni ottanta nella ghiandola mammaria di topo al quale era stata somministrata relassina porcina (Bani e Bigazzi, 1984); nel medesimo modello sperimentale, è stato dimostrato che l'effetto coinvolge anche i capillari, seppur privi nella loro parete di una tunica muscolare (Bani et al., 1988).

L'effetto vasodilatatorio dell'ormone è stato osservato non soltanto a livello dell'apparato riproduttivo, ma anche nel mesoceco (Bigazzi et al., 1986), nelle arterie coronarie di ratto e cavia (Bani-Sacchi et al., 1995), nel microcircolo polmonare di ratto (Bani et al., 1997), nell'ingluvia di piccione (Bigazzi et al., 1998), nel circolo renale (Novak et al., 2001) e nei sinusoidi epatici di ratto (Bani et al., 2001).

La vasodilatazione prodotta dalla relassina sulle arterie coronarie si traduce in un aumento significativo del flusso sanguigno, che nei modelli di cavia e ratto risulta essere 100 volte più intenso rispetto a quello prodotto dall'acetilcolina e 1000 volte più intenso rispetto a quello prodotto dal nitroprussiato di sodio (Bani-Sacchi et al., 1995; Bani et al., 1998). Quest'azione vaso-attiva è determinata da una aumentata produzione endogena di NO da parte delle cellule della parete dei vasi sanguigni; studi effettuati su cavia e ratto dimostrano infatti come il trattamento con NG-monometil-L-arginina, inibitore competitivo della NOS, annulli tale effetto (Bani-Sacchi et al., 1995; Bani et al., 1998).

Ulteriori studi condotti su ratto hanno messo in evidenza che l'aumento dei livelli di NO nelle cellule endoteliali dei vasi coronarici

è determinato da una maggiore espressione della NOS II (Failli et al., 2002).

Esperimenti *in vitro* su cellule muscolari lisce di aorta bovina hanno inoltre dimostrato che la relassina determina il rilasciamento dell'apparato contrattile, mediante un meccanismo che prevede l'attivazione di NF-kB e l'induzione della NOS II, il cui prodotto determina a sua volta l'aumento di cGMP (Bani et al., 1998). L'aumento di cGMP causa la diminuzione della concentrazione di calcio intracellulare e conseguente rilasciamento dell'apparato contrattile.

Le proprietà vasodilatatorie che la relassina esplica in numerosi organi bersaglio ed i suoi effetti diretti sulle cellule della parete vasale suggeriscono un coinvolgimento di questo ormone nella regolazione della pressione arteriosa e nelle relative patologie. A questo riguardo, studi condotti su ratti spontaneamente ipertesi hanno dimostrato che l'infusione intravenosa di relassina determina un'importante riduzione della pressione arteriosa, mentre alle stesse dosi non ha effetti degni di nota in ratti di controllo normotesi (St.Louis e Massicote, 1985).

E' stato inoltre dimostrato che il trattamento con relassina ricombinante H2 riduce la pressione nel ventricolo destro ed il contenuto di collagene nella parete delle arterie polmonari in un modello di ipertensione polmonare ottenuto nel ratto (Tozzi et al., 2005).

La relassina influisce anche indirettamente sulla regolazione della pressione arteriosa, modificando l'assunzione di acqua nel ratto, attraverso i neuroni dell'organo subfornicale (Sunn et al., 2002).

E' stato anche dimostrato che, oltre a svolgere un ruolo nell'omeostasi sanguigna, la relassina è in grado di promuovere l'angiogenesi. Studi *in vitro* su cellule endometriali umane hanno

infatti dimostrato che quest'ormone stimola la produzione di potenti agenti pro-angiogenetici, quali il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) ed il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) (Unemori et al., 1999). Effetti analoghi si sono osservati in macrofagi coinvolti nel processo di guarigione delle ferite, in modelli sperimentali ottenuti nei roditori (Unemori et al., 2000).

ELEMENTI FIGURATI DEL SANGUE

La relassina è in grado di regolare l'omeostasi sanguigna anche influenzando il numero e l'attività delle piastrine. Da studi effettuati su sangue di coniglio e di ratto è infatti emerso che la relassina è in grado sia di inibire l'aggregazione piastrinica, stimolando la produzione endogena di NO, sia di diminuire il numero di piastrine circolanti, impedendone il rilascio da parte dei megacariociti (Bani et al., 1995).

La relassina promuove inoltre la fibrinolisi, stimolando la liberazione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (Qin et al., 1997; Wang-Lee et al., 1998; Bigazzi et al., 1995).

Attraverso la modulazione della produzione di NO, la relassina esplica le sue proprietà anti-infiammatorie: inibisce infatti l'attivazione dei granulociti neutrofili e la loro adesione alle cellule endoteliali (Nistri et al., 2003; Masini et al., 2004); inibisce l'attivazione immunologica dei granulociti basofili, riducendo il rilascio di istamina e degli altri mediatori (Masini et al., 1997); inibisce il rilascio di istamina da parte dei mastociti in modelli di infiammazione in cavia e ratto (Masini et al., 1994; Bani et al., 2002).

CUORE

E' stato dimostrato che la relassina possiede recettori specifici nel cuore e che viene prodotta e secreta dai cardiomiociti, specialmente da quelli residenti nell'atrio destro, in condizioni fisiologiche (Osheroff et al., 1992). Inoltre, Dschietzig e collaboratori hanno osservato come in condizioni patologiche, ad esempio in pazienti con scompenso cardiaco, l'ormone venga secreto in misura maggiore, proporzionalmente all'entità della disfunzione contrattile (Dschietzig et al., 2001).

Essendo prodotta dal cuore e legandosi a recettori specifici su di esso, la relassina può essere a buon diritto considerata una molecola cardiotropica ad azione autocrina-paracrina.

Numerosi studi *ex vivo* hanno dimostrato che la relassina esercita un effetto cronotropo positivo (aumento della frequenza di contrazione) sia nel cuore intero perfuso, che nell'atrio destro e sinistro isolati ed anche nella porzione ventricolare (Ward et al., 1992; Kakouris et al., 1992; Han et al., 1994; Tan et al., 1998; Conrad et al., 2004). L'effetto cronotropo positivo attribuito alla relassina risulta confermato anche da esperimenti *in vivo* condotti sul ratto (Ward et al., 1992; Kakouris et al., 1992; Han et al., 1994; Tan et al., 1998; Conrad et al., 2004).

La relassina è capace di influenzare la frequenza cardiaca attraverso un aumento nei cardiomiociti di cAMP intracellulare, che attiva a sua volta una proteina chinasi cAMP-dipendente; quest'ultimo mediatore determina un incremento della concentrazione di calcio intracellulare, con un conseguente aumento di intensità della corrente di tipo L mediata dai canali del calcio (Han et al., 1994).

Esperimenti condotti sull'atrio isolato di ratto hanno messo in luce che l'effetto cronotropo positivo indotto dalla relassina risulta maggiormente efficace rispetto a quello prodotto da sostanze, quali l'endotelina-1, l'angiotensina-II, l'isoproterenolo, l'adrenalina,

l'istamina e la serotonina, accreditate come acceleratori della frequenza cardiaca (Kakouris et al., 1992).

Mediante esperimenti *in vitro* condotti su cardiomiociti atriali di ratto è stato dimostrato che la relassina, oltre ad avere un effetto cronotropo positivo, esercita anche un effetto inotropo positivo (aumento della contrattilità), incrementando la durata del potenziale d'azione e dell'influsso del calcio nelle cellule (Piedras-Renterira et al., 1997).

Esperimenti condotti su cuore perfuso di ratto, hanno mostrato che la relassina induce la secrezione di peptide natriuretico-atriale (ANP), attraverso cui potrebbe controllare l'omeostasi sanguigna. (Toth et al., 1996).

EFFETTI DELLA RELASSINA SUL DANNO DA ISCHEMIA-RIPERFUSIONE

Gli effetti che la relassina esplica nel cuore, e più in generale su tutto l'apparato cardiocircolatorio, hanno suggerito una sua possibile applicazione clinica nel trattamento delle patologie cardiovascolari. Tra queste, l'infarto miocardico rappresenta la maggiore causa di morte nei paesi industrializzati e determina complicanze a lungo termine nei pazienti che riescono a superare la fase acuta (Wollert e Drexle, 2010).

L'infarto del miocardio è causato da fenomeni di ischemia e successiva riperfusione, dai quali si genera un danno all'endotelio coronarico, che, tramite una cascata di eventi, determina il reclutamento e l'attivazione di leucociti, sorgente primaria di mediatori infiammatori e di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS, oltre a causare il rilascio di istamina, potente fattore aritmogeno, determinano la perossidazione dei lipidi di membrana

ed aumento della concentrazione di calcio intracellulare, che inducono nei cardiomiociti un danno irreversibile e infine necrosi. Questa cascata di eventi si traduce in aritmie, danni estesi al tessuto miocardico e, in alcuni casi, disfunzioni contrattili letali, quali fibrillazione ventricolare e asistolia.

Per studiare quale potesse essere il beneficio clinico apportato dalla relassina nel trattamento dell'infarto, sono stati creati modelli sperimentali di danno miocardico acuto indotto da ischemia-riperfusion, sia *ex vivo* su cuori isolati e perfusi secondo la tecnica di Langendorff sia *in vivo* mediante legatura temporanea di un grosso vaso arterioso coronarico.

Studi *ex vivo* condotti su cuori di cavia, aggiungendo relassina porcina al liquido di perfusione prima della legatura della coronaria, hanno evidenziato come l'ormone fosse in grado di aumentare il flusso sanguigno coronarico già durante l'ischemia e in modo maggiore nella riperfusione (Masini et al., 1997). Tale effetto deriva dalla capacità della relassina di dilatare i vasi coronarici del circolo collaterale, ben sviluppati nella cavia, con aumentata perfusione nell'area peri-ischemica. Attraverso questo meccanismo, la relassina diminuisce la gravità dell'ischemia e facilita la rimozione dei mediatori infiammatori e dei ROS durante la riperfusione.

In un modello *in vivo* di infarto acuto su ratto, sono stati ottenuti risultati analoghi, somministrando per via endovenosa relassina porcina un'ora prima dell'induzione dell'ischemia (Bani et al., 1998). Si è infatti ottenuto una minore estensione dell'area di miocardio lesa e una diminuita produzione di ROS, come dimostrato dai ridotti livelli cardiaci di malonildialdeide (marker di perossidazione lipidica), nonché una minore infiltrazione del tessuto ventricolare da parte di leucociti attivati, evidenziata dalla ridotta attività della mieloperossidasi (Bradley et al., 1982; Mullane et al., 1985). A livello

ultrastrutturale, mancano gli aspetti di necrosi cellulare ed i cardiomiociti dell'area ischemizzata presentano un minor grado di ipercontrazione delle miofibrille e di accumulo di calcio nei mitocondri.

Zhang e collaboratori hanno invece valutato gli effetti della relaxina 3, somministrata con iniezioni sottocutanee, in un modello di danno ischemico nel cuore di ratto, ottenuto per sovraccarico funzionale tramite isoproterenolo. L'induzione del danno cardiaco provoca un aumento del livello di relaxina 3 sia nel miocardio sia nel plasma, mentre la somministrazione esogena dell'ormone determina una diminuzione del contenuto di malonildialdeide nel miocardio e del rilascio in circolo di enzimi di miocitolisi, quali la lattato deidrogenasi e la creatina fosfochinasi (Zhang et al., 2005).

Questi studi hanno dimostrato che la relaxina svolge un'azione protettiva nei confronti del miocardio sottoposto a danno ischemico, qualora sia somministrata precedentemente all'insulto, suggerendone un possibile impiego terapeutico preventivo nei confronti dell'infarto cardiaco.

In seguito sono stati messi a punto studi per valutare se la relaxina potesse apportare vantaggi terapeutici anche se somministrata successivamente all'evento ischemico, tentando così di colmare il gap tra modello sperimentale e realtà clinica, nella quale le possibili terapie miocardio-protettive possono essere effettuate solamente al momento dell'ospedalizzazione, e quindi dopo del tempo dall'esordio dell'ischemia, se non addirittura al momento della riapertura chirurgica dell'arteria coronaria occlusa (riperfusion). Con questo intento, Perna e collaboratori hanno effettuato esperimenti su modelli di infarto miocardico acuto nel maiale aggiungendo relaxina H2 ricombinante al mezzo di riperfusion 30 minuti dopo l'ischemia, in coincidenza con l'avvio della riperfusion del ventricolo

ischemizzato. In tale modello, la relassina determina una riduzione dose-dipendente dei marker sierici di miocitolisi, quali la mioglobina e la troponina T, riduce l'apoptosi dei cardiomiociti e le disfunzioni contrattili del miocardio, aumentando l'indice di performance ventricolare (Perna et al., 2005).

L'impiego della relassina nel trattamento dell'infarto acuto del miocardio potrebbe dunque avere finalità non più solamente preventive, ma anche terapeutiche.

Gli effetti cardioprotettivi di questo ormone possono essere anche attribuiti alle proprietà di indurre:

- ✦ dilatazione dei vasi coronarici (Bani Sacchi et al., 1995)
- ✦ diminuzione dell'adesività dell'endotelio per i leucociti e della loro infiltrazione nel tessuto lesa (Nistri et al., 2003)
- ✦ riduzione dell'attività dei mastociti e del reclutamento locale di leucociti, con conseguente diminuzione della liberazione di mediatori infiammatori, causa primaria delle aritmie ventricolari (Bani et al., 1998; Masini et al., 1997)
- ✦ diminuzione dell'aggregazione piastrinica e induzione di sostanze fibrinolitiche (Bani et al., 1995; Qin et al., 1997; Wang-Lee et al., 1998; Bigazzi et al., 1995)

APPLICAZIONE DELLA RELASSINA ALLA CARDIOMIOPLASTICA CELLULARE

La terapia per la cardiopatia ischemica è divenuta una delle sfide più impegnative della medicina moderna. L'impatto che questa patologia ha acquisito in termini di mortalità e di richiesta di ospedalizzazione è infatti in crescita costante, anche a causa dell'aumentata aspettativa di vita. Negli ultimi decenni le strategie per la prevenzione primaria ed il miglioramento dei protocolli terapeutici

d'urgenza hanno infatti permesso ad un numero sempre crescente di pazienti di sopravvivere alla fase acuta dell'infarto miocardico, determinando di contro l'esigenza di una terapia volta a contrastare le complicazioni a lungo termine indotte dal rimodellamento cardiaco, inteso come la complessa serie di eventi riparativi che coinvolgono il ventricolo lesa e che conducono ad un progressivo decadimento della *performance* contrattile del cuore, fino alla comparsa di una condizione di scompenso cardiaco (Jaber et al., 2006).

Sebbene, come molti organi differenziati, anche il cuore adulto possieda cellule staminali (Beltrami et al., 2003), esse non sono capaci intrinsecamente di rigenerare efficacemente l'area danneggiata in seguito all'ischemia (Rubart e Field, 2006), che viene sostituita invece da tessuto cicatriziale, con conseguente evoluzione clinica verso lo scompenso cardiaco. Tra le differenti terapie sperimentate, quella ritenuta più promettente è la cardiomioplastica cellulare (CCM), che prevede l'inserimento di cellule staminali esogene nel contesto del tessuto miocardico danneggiato, le quali abbiano la capacità di promuovere la rigenerazione del muscolo cardiaco, ripristinandone la funzionalità (Rubart et al., 2006). Affinché la CCM possa essere utilizzata in ambito clinico, devono essere stabiliti quali tecniche e tipi cellulari siano più efficaci per l'impianto.

Sono state sperimentate due diverse vie di somministrazione delle cellule: l'infusione intra-coronarica, attualmente la più promettente, e l'inoculazione intra-miocardica diretta per via chirurgica (epicardica) o tramite utilizzo di cateteri (endocardica) (Dimmeler et al., 2005).

L'infusione intra-coronarica permette alle cellule impiantate di circolare nelle aree di miocardio con maggior afflusso sanguigno e

ricche di nutrienti ed ossigeno, creando così le condizioni favorevoli per aumentare la percentuale di sopravvivenza dopo l'inoculo; tuttavia, la scarsa presenza di vasi nel tessuto cicatriziale post-infartuato può diminuire l'efficienza di colonizzazione (Hristov et al., 2006; Suzuki et al., 2004).

L'inoculo diretto via catetere o in sede di toracotomia evita invece che le cellule impiantate debbano attraversare i vasi per giungere nell'area lesa, ma, oltre alla possibilità di perforazione ventricolare, questa tecnica comporta il rischio che le cellule iniettate direttamente nel tessuto danneggiato non sopravvivano per mancanza di nutrienti o restino concentrate in cluster, che possono evolvere in foci aritmogenici (Dimmeler et al., 2005; Smits et al., 2003).

Anche il problema della scelta del tipo cellulare più adatto per l'impianto non è di facile risoluzione, poiché occorre trovare il giusto compromesso tra la resa, intesa come efficienza di isolamento ed espansione *in vitro*, e potenzialità di differenziamento cardiomiogenico. In quest'ottica, svariate linee di cellule staminali sono state sottoposte a valutazioni sperimentali. Un primo tipo cellulare proposto sono stati i mioblasti scheletrici, precursori indifferenziati delle fibre muscolari scheletriche (Koh et al., 1993; Taylor et al., 1998), isolati da biopsie muscolari, coltivati *in vitro* e infine re-impiantati nella parete ventricolare (Tse et al., 2003).

Un'altra fonte importante di cellule usate per la CCM è stata il midollo osseo, che contiene cellule progenitrici adulte multipotenti (MAPCs) appartenenti ad un set di cellule staminali mesenchimali (MSCs) (Jiang et al., 2002), come pure cellule progenitrici endoteliali (EPCs) (Asahara et al., 1999). Tali staminali vengono isolate dal midollo osseo ovvero dal sangue periferico, selezionate *ex vivo*, eventualmente espanse in coltura ed infine re-impiantate.

Nonostante le aspettative, i risultati ottenuti dagli studi pilota relativi alla CCM sono in buona sostanza controversi e le ragioni alla base dei benefici funzionali, quando presenti, non sono ancora del tutto chiare. In nessun caso infatti le cellule staminali esogene impiantate hanno dimostrato la capacità di trans-differenziare ed acquisire il fenotipo cardiaco (Nygren et al., 2004; Rubart et al., 2006; Hristov et al., 2006). Anzi, i mioblasti scheletrici, che in teoria avrebbero dovuto più facilmente dare origine a nuovi cardiomiociti, normalmente si differenziavano in miotubi, i quali rimanevano inclusi nella cicatrice infartuale senza contrarre connessioni né elettriche, né funzionali con i cardiomiociti residenti (Leobon et al., 2003).

Tuttavia, l'esperienza sperimentale e clinica è concorde nel rilevare che in molti casi le cellule inoculate, quale che sia la loro natura, migliorano in effetti il quadro funzionale del cuore post-infartuato, non tanto trans-differenziando in senso cardiomiocitario e ripopolando l'area lesa, ma verosimilmente agendo in senso migliorativo sul rimodellamento cardiaco post-infartuale attraverso un meccanismo indiretto o paracrino (Rubart et al., 2006; Caplice, 2006). Esperimenti effettuati iniettando MSC in cuori di ratto post-infartuato dimostrano infatti che, ad 8 settimane dall'impianto, le cellule staminali esogene non acquisiscono il fenotipo cardiaco; eppure, il miocardio presenta una importante riduzione della fibrosi, una minor dilatazione del ventricolo sinistro e una migliore funzionalità sistolica/diastolica rispetto agli animali di controllo (Berry et al., 2006).

Le cellule esogene impiantate dunque non generano nuovi cardiomiociti, ma, attraverso un meccanismo paracrino, riducono la rigidità del tessuto cicatriziale, preservando la funzionalità contrattile (Berry et al., 2006).

Un'interessante prospettiva per il futuro della terapia cellulare potrebbe essere di potenziare l'effetto benefico prodotto dalle cellule staminali impiantate, sfruttandole come carrier per geni codificanti sostanze cardiotropiche ad azione paracrina (Ye et al., 2006).

Un buon candidato per questa terapia genica associata a CCM potrebbe essere la relassina, in quanto capace di aumentare la perfusione cardiaca (Bani Sacchi et al., 1995), promuovere la neoangiogenesi (Unemori et al., 2000) e ridurre la fibrosi, promuovendo il turn-over del collagene (Samuel et al., 2004).

La relassina inoltre potrebbe favorire la colonizzazione del tessuto cardiaco da parte delle cellule impiantate: uno studio *in vitro* condotto su co-culture di mioblasti scheletrici murini e cardiomiociti di ratto dimostra infatti come il trattamento con relassina H2 favorisca l'accoppiamento inter-cellulare tra cardiomiociti e tra cardiomiociti e mioblasti non soltanto attraverso la formazione di nuove giunzioni, ma anche attraverso il potenziamento delle capacità elettriche delle giunzioni pre-esistenti (Formigli et al., 2005).

Uno studio pionieristico condotto su un modello di infarto miocardico cronico indotto nel maiale ha dimostrato che l'inoculo di mioblasti scheletrici murini, ingegnerizzati per la produzione di relassina H2, induce il miglioramento funzionale del miocardio post-infartuato, verosimilmente favorendo il rimodellamento della matrice extra-cellulare ed incrementando la densità microvascolare (Formigli et al., 2007). Si sono quindi resi necessari ulteriori studi sia per comprendere i meccanismi alla base del miglioramento funzionale osservato, sia per meglio definire i possibili protocolli terapeutici. Con queste premesse è stato progettato uno studio *in vivo* condotto su un modello di infarto cronico nel ratto, per capire come l'impianto di mioblasti scheletrici murini C2C12 wild-type o ingegnerizzati per la produzione di relassina H2 e la

somministrazione esogena dell'ormone possano contrastare i danni a lungo termine dovuti all'avverso rimodellamento cardiaco. Questo studio è oggetto di parte della presente tesi.

Materiali e Metodi

COLTURA E PRODUZIONE DI MIOBLASTI SCHELETRICI C2C12 TRASFETTATI

I mioblasti scheletrici murini C2C12 sono stati coltivati in DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino e 0,1% di gentamicina. Le cellule sono state trasfettate con un vettore lentivirale bicistronico contenente il cDNA della pre-prorelassina H2 ed il gene per la green-fluorescent protein (GFP) (C2C12/RLX) oppure soltanto con il gene per GFP (C2C12/GFP) sotto un promotore del citomegalovirus (Silvertown et al., 2006). Dopo 2 giorni di coltura, il sovrinatante delle cellule C2C12/RLX, dosato tramite saggio ELISA specifico per la relassina H2, conteneva 1.8 ± 0.2 ng/ml di relassina.

I cloni cellulari sono stati selezionati con il metodo del cloning ring e analizzati per l'espressione di GFP al microscopio a fluorescenza e mediante citofluorimetro.

TRATTAMENTO CHIRURGICO E PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Il protocollo sperimentale è in accordo con quanto disposto nella Dichiarazione di Helsinki e nelle linee guida della Comunità Europea (86/609/CE) a proposito di sperimentazione animale. Tale protocollo è stato approvato dall'apposito comitato etico dell'Università di Firenze.

Ratti maschi Wistar di circa 250 g di peso, in anestesia generale e ventilati artificialmente, sono stati sottoposti a legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore sinistra dopo il primo ramo diagonale per indurre l'infarto del miocardio (Suzuki et al., 2004). Gli animali sono stati quindi mantenuti per 12 ore in condizioni ambientali controllate con elevati valori di pO_2 , per facilitare la

ripresa della normale attività respiratoria e della normale frequenza cardiaca (350-450 battiti/minuto). Trenta giorni dopo l'intervento (tempo T₁), gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali:

-gruppo 1, animali infartuati di controllo (n=5): i ratti sono stati operati una seconda volta ed è stato loro inserito un catetere nella vena magna cardiaca per il rilascio di 1 ml di DMEM.

-gruppo 2, animali infartuati trattati con relassina esogena (RLX) (n=5): i ratti sono stati operati una seconda volta, seguendo la procedura effettuata per gli animali del gruppo 1, ed è stata loro impiantata nella cavità toracica una mini-pompa osmotica per la somministrazione di relassina H₂ (gentilmente fornita dalla Fondazione RRCA, Istituto Prosperius, Firenze, Italia) in dose di 1 µg) al giorno per 28 giorni.

-gruppo 3, animali infartuati trattati con C2C12/GFP (n=5): i ratti sono stati operati una seconda volta e cateterizzati per l'inoculo in circolo di mioblasti C2C12/GFP (2x10⁶ cellule in 1 ml di DMEM).

-gruppo 4, animali infartuati trattati con C2C12/RLX+RLX (n=5): i ratti sono stati operati una seconda volta e cateterizzati per l'inoculo di mioblasti C2C12/RLX (2x10⁶ cellule in 1 ml di DMEM). E' inoltre stata impiantata nella cavità toracica una mini-pompa osmotica per il rilascio di relassina H₂ in dose di 1 µg al giorno per 28 giorni (come per gli animali del gruppo 2).

Tutti gli animali sono stati trattati con somministrazione giornaliera di ciclosporina (15 mg/Kg) per ottenere un effetto immunosoppressivo ed aumentare così le possibilità di colonizzazione del miocardio leso da parte delle cellule eterologhe. La mortalità a seguito del primo intervento si è attestata sul 30%, mentre è aumentata fino al 40-50% dopo il secondo intervento. I livelli di relassina H₂ circolante negli animali appartenenti ai gruppi 2 e 4 sono stati valutati in campioni di plasma isolati da sangue periferico,

mediante saggio ELISA a 1 mese (T2) e 2 mesi (T3) dall'impianto delle mini-pompe osmotiche.

ECOCARDIOGRAFIA

Tutti gli animali sono stati anestetizzati e sottoposti ad ecocardiografia bidimensionale trans-toracica M-mode, per valutare la funzionalità cardiaca, secondo i seguenti parametri (Morgan et al., 2004):

- diametro telediastolico del ventricolare sinistro (LVEDD)
- diametro telesistolico del ventricolare sinistro (LVESD)
- frazione di accorciamento (FS)
- frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF)
- indice di performance cardiaca (MPI), calcolato come somma della contrazione isovolumetrica e del tempo di rilassamento, diviso per il tempo di eiezione (Jegger et al., 2006)

L'ecocardiografia è stata effettuata su tutti gli animali a To, ad 1 mese (T2) e 2 mesi (T3) dopo i trattamenti.

TOMOGRAFIA AD EMISSIONE DI POSITRONI (PET)

A tutti gli animali è stata eseguita una scansione Micro-PET dopo somministrazione del tracciante vitale 18-fluorodesossiglucosio (18F-FDG). Il 18F-FDG è un analogo del glucosio, capace di emettere positroni ed è impiegato per valutare il metabolismo del glucosio nel cuore e nell'encefalo, fornendo così una misura indiretta della vitalità delle cellule.

La scansione Micro-PET è stata effettuata su tutti gli animali a T1 (30 giorni dopo l'induzione dell'infarto) e ad 1 mese (T2) e 2 mesi (T3) dopo i trattamenti.

PRELIEVO E CAMPIONAMENTO DEI TESSUTI

Al termine delle analisi funzionali a T3, i ratti sono stati sacrificati per iniezione letale di pentobarbital sodico. Per ogni animale, sono stati prelevati frammenti di tessuto ischemico a valle dell'occlusione coronarica e di tessuto non ischemico dal setto inter-ventricolare. Per ogni zona, un campione è stato fissato in paraformaldeide al 3% in PBS o in formalina tamponata al 4%, disidratato in etanolo ed incluso in paraffina, un secondo campione è stato fissato in glutaraldeide 4% in tampone cacodilato per l'esame ultrastrutturale, un ulteriore campione è stato crioprotetto in saccarosio al 30% in PBS, congelato e conservato a -80°C fino al suo utilizzo.

IMMUNOFLUORESCENZA IN MICROSCOPIA CONFOCALE

Per valutare l'integrazione dei mioblasti impiantati nella zona infartuata, sono state condotte analisi immunoistochimiche in fluorescenza con anticorpo monoclonale anti-eGFP (1:200), su sezioni criostatate dello spessore di 10 µm. Sono stati effettuati controlli negativi utilizzando siero non immune di coniglio al posto dell'anticorpo primario. Immagini digitali di uno stesso campo ottenute in fluorescenza e in contrasto di fase sono state combinate assieme per maggior chiarezza.

ULTRASTRUTTURA DEL TESSUTO CARDIACO

Alcuni campioni di tessuto fissati in glutaraldeide sono stati post-fissati in tetrossido di osmio, inclusi in Epon 812 e sezionati per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Altri frammenti, non fissati in osmio per meglio preservare l'antigenicità delle proteine cellulari, sono stati usati per analisi di immuno-elettro-microscopia per la rivelazione della produzione di relassina da parte delle cellule C2C12/RLX impiantate. Sezioni ultra-fini dei frammenti collezionati sono state incubate con siero non immune di capra (1:20) per saturare i siti di legame aspecifici e successivamente con anticorpo policlonale anti-relassina H2 (10 µg/ml). Sono stati effettuati controlli negativi utilizzando siero non immune di coniglio al posto dell'anticorpo primario. Tutte le sezioni sono state contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo ed esaminate ad un microscopio elettronico Jeol 1010 (Jeol, Tokyo, Giappone) a 80 kV.

DETERMINAZIONE DELLA FIBROSI

La valutazione della fibrosi cicatriziale è stata effettuata con metodi morfologici qualitativi e quantitativi, utilizzando campioni fissati in formalina tamponata al 4% e inclusi in paraffina, da cui sono state ottenute sezioni di 7 µm di spessore. I preparati sono stati colorati con la colorazione di Azan per il tessuto connettivo, modificata omettendo l'uso dell'azocarminio e dell'orange G per ridurre la colorazione di fondo del parenchima. Da questi sono state acquisite immagini digitali tramite fotocamera applicata ad un microscopio ottico con obiettivo 25X . Per ogni campo microscopico, sono state misurate l'area complessiva (A) e la densità ottica (DO) delle fibre collagene, selezionate mediante un'apposita soglia per escludere il

resto del tessuto. Per ogni animale è stato calcolato un indice di sclerosi (IS) secondo la seguente formula:

$$IS = A \times DO \times 10^{-6}$$

DETERMINAZIONE DELLA DENSITA' MICROVASCOLARE (MVD)

La MVD nel tessuto cicatriziale cardiaco è stata misurata attraverso la conta per punti su sezioni semi-fini di campioni inclusi in Epon 812 (dieci campi microscopici per campione) (Formigli et al., 2007). Su ogni immagine è stata sovrapposta una griglia con 130 punti di intersezione ed è stato contato il numero di microvasi del preparato che coincidevano con i punti di intersezione della griglia. Sono state mediate le misurazioni ottenute da due diversi osservatori.

DETERMINAZIONE DELLE CELLULE CARDIACHE IN APOPTOSI

Il numero di cellule in apoptosi è stato valutato su sezioni di tessuto incluso in paraffina mediante saggio TUNEL, usando il kit FragEL-Klenow DNA Fragmentation Detection.

Per ogni campione sono stati acquisiti 4 campi microscopici e di ognuno è stato contato il numero dei nuclei positivi alla reazione rispetto al numero dei nuclei totali.

Sono state mediate le misurazioni ottenute da due diversi osservatori.

DETERMINAZIONE DELLE CELLULE CARDIACHE CICLANTI

Il numero di cellule ciclanti è stato valutato su sezioni di tessuto incluso in paraffina, mediante reazione immunostochimica diretta

contro la ciclina riconosciuta dall'anticorpo monoclonale anti-Ki-67, 1:50). Sono stati effettuati controlli negativi utilizzando PBS al posto dell'anticorpo primario.

Per ogni campione sono stati acquisiti 4 campi microscopici e di ognuno è stato contato il numero dei nuclei positivi alla reazione rispetto al numero di nuclei totali. Sono state mediate le misurazioni ottenute da due osservatori distinti ed indipendenti.

ANALISI STATISTICA

I valori sono stati riportati come media \pm errore standard della media (SEM) per ogni gruppo di animali. Le differenze sperimentali tra i gruppi sono state valutate mediante test ANOVA ad una via seguito da test di confronto multiplo di Newman-Keuls. I calcoli sono stati eseguiti con il programma di statistica Prism 4.0.

Risultati

ECOCARDIOGRAFIA

In tutti gli animali, l'induzione chirurgica dell'infarto ha generato un marcato peggioramento dei parametri ecocardiografici di funzionalità cardiaca: un mese dopo l'intervento, al tempo T1, i valori di LVEF e FS risultavano infatti significativamente ridotti, mentre i valori di LVEDD, LVESD e MPI erano significativamente aumentati rispetto al tempo T0 (Fig.4). Negli animali di controllo (gruppo 1) i parametri funzionali sono poi rimasti invariati al tempo T2 e T3, mentre sono cambiati in modo statisticamente significativo negli animali sottoposti ai diversi trattamenti. In particolare, il valore di LVEF è aumentato nei ratti trattati con C2C12/RLX +RLX (gruppo 4); il valore di FS è invece aumentato negli animali del gruppo 2 (a cui è stata somministrata la sola relassina) e in quelli del gruppo 4 al tempo T2, mentre al tempo T3 è aumentato in tutti gli animali trattati, in particolar modo in quelli del gruppo 4; i valori di LVEDD e LVESD si sono ridotti al tempo T2 in tutti i ratti trattati e la riduzione si è ulteriormente accentuata al tempo T3; i valori di MPI sono diminuiti in modo simile in tutti gli animali trattati al tempo T2 e maggiormente al tempo T3.

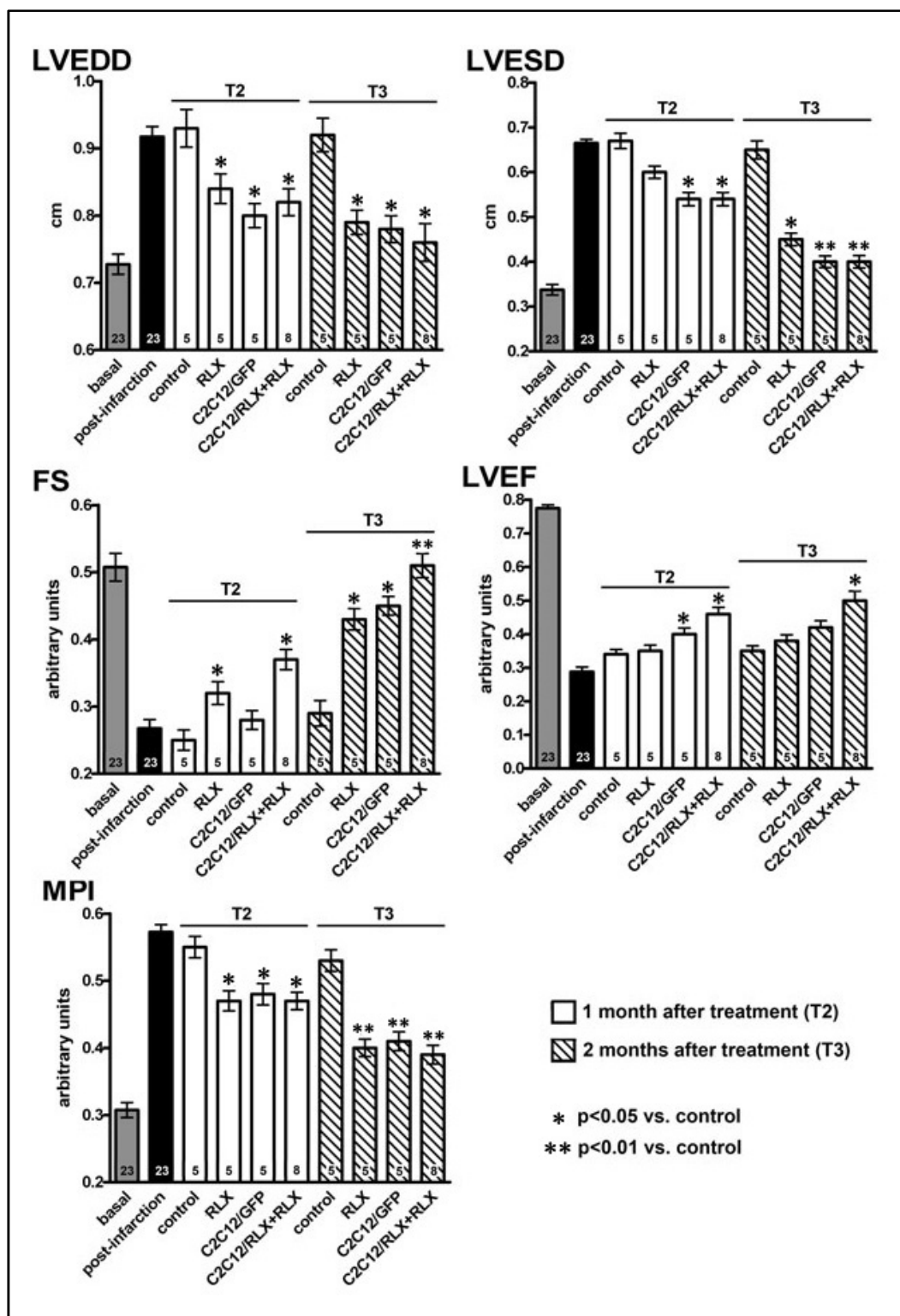


Fig.4 Parametri ecocardiografici ai diversi time-point

MICRO-PET

Un mese dopo l'induzione dell'infarto, i ratti di tutti i gruppi sperimentali hanno mostrato un marcata diminuzione dell'area di miocardio vitale. La porzione lesa, localizzata particolarmente nella regione antero-settale della parete del ventricolo sinistro, appare ipometabolica e quindi non captante (Fig.5). Il trattamento con C2C12/RLX+RLX induce un aumento significativo ($P < 0,01$) del volume di miocardio vitale al tempo T2 ed in misura maggiore al tempo T3, con un incremento rispetto al tempo T1 che si attesta al 16% ed al 31%. Anche il trattamento con C2C12/GFP aumenta la vitalità del miocardio in modo significativo ($p < 0,05$), ad indicare che la sola relassina non ha un effetto determinante sulla modulazione di questo parametro.

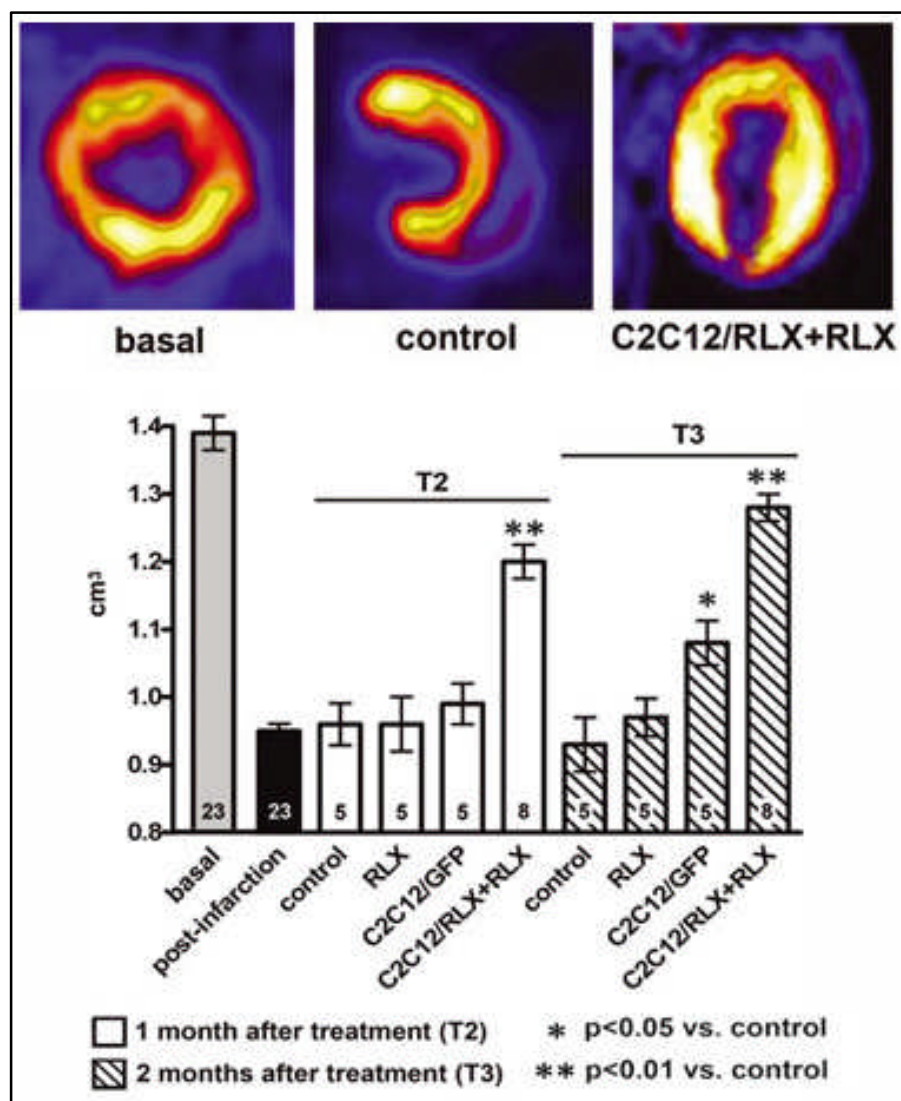


Fig.5 Vitalità del miocardio valutata mediante MICRO-PET

LOCALIZZAZIONE DELLE CELLULE IMPIANTATE

Le analisi immunoistochimiche in fluorescenza per la proteina marker GFP rivelano una scarsa presenza di mioblasti immunomarcati impiantati nel tessuto cardiaco; da un'analisi comparativa è risultato che i cuori degli animali trattati con C2C12/GFP hanno una minore immuno-reattività rispetto ai cuori dei ratti trattati con C2C12/RLX+RLX (Fig.6). Le cellule impiantate sono localizzate esclusivamente nel tessuto cicatriziale, per la

maggior parte in prossimità dei vasi sanguigni, mentre non sono presenti nel miocardio vitale, estraneo agli eventi di rimodellamento.

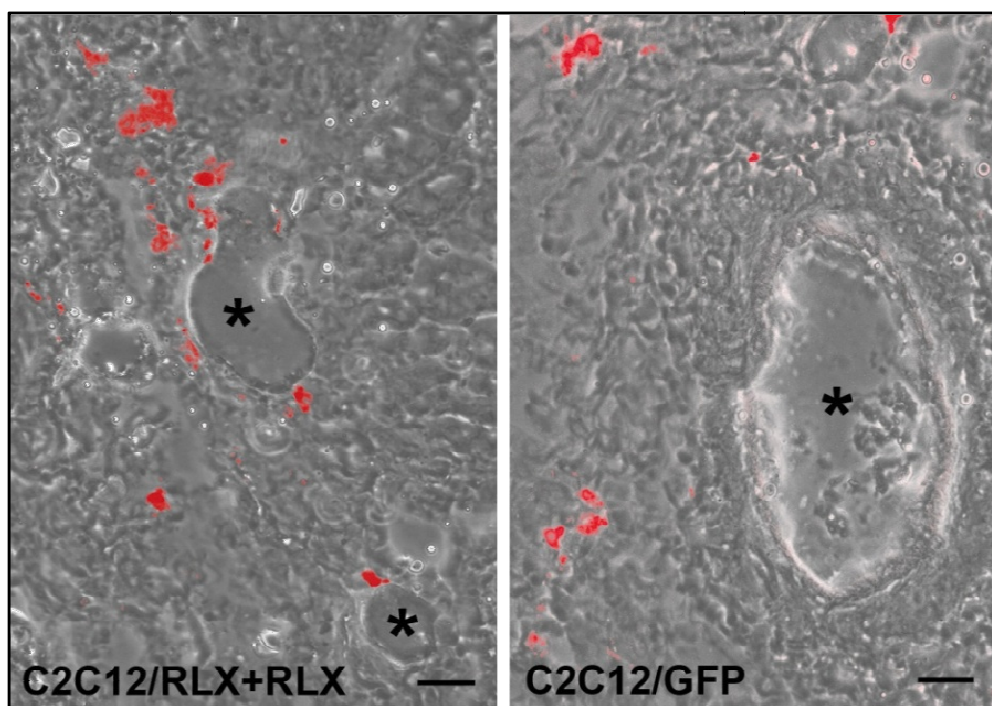


Fig.6 Immunofluorescenza per la localizzazione delle cellule impiantate

Le analisi di immuno-elettro-microscopia per l'identificazione endocellulare della relassina H2 hanno evidenziato che le C2C12/RLX impiantate nel cuore dei ratti del gruppo 4 producevano effettivamente l'ormone, come dimostra la presenza di particelle di oro colloidale a livello degli organuli coinvolti nella sintesi proteica, quali reticolo endoplasmatico ruvido (RER) e cisterne dell'apparato di Golgi (Fig.7). Nel tessuto cicatriziale i mioblasti impiantati sono ben distinguibili dai fibroblasti residenti attivati, poiché non mostrano segni di secrezione di collagene o formazione di fibrille.

E' importante inoltre sottolineare che in nessun caso esaminato le cellule C2C12 impiantate hanno mostrato la tendenza all'acquisizione del fenotipo cardiaco, a dimostrazione della loro incapacità di rigenerare il tessuto contrattile danneggiato.

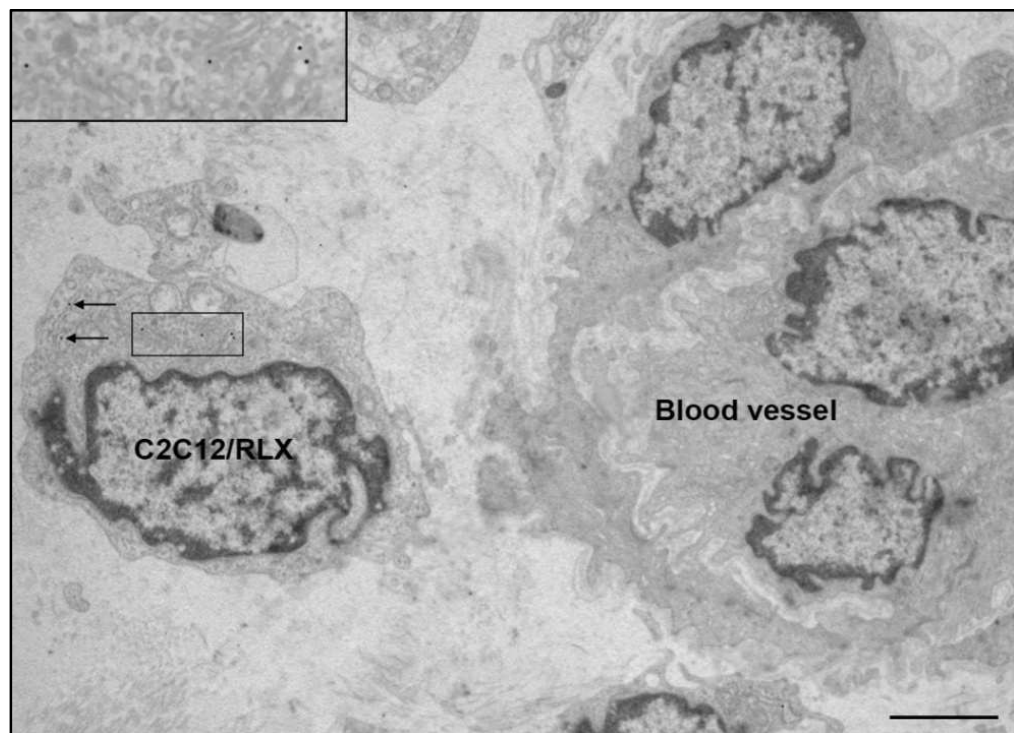


Fig.7 Immuno-elettro-microscopia

CARATTERISTICHE STRUTTURALI ED ULTRASTRUTTURALI DEL TESSUTO CARDIACO LESO

La colorazione modificata di Azan ha evidenziato densi accumuli di fibre collagene nel tessuto cicatriziale del cuore post-infartuato prelevato da animali di controllo. Al contrario, nei campioni relativi agli animali trattati con relassina del gruppo 2 e del gruppo 4 la quantità di fibre collagene era notevolmente ridotta (Fig.8, pannello superiore), come dimostrato anche dall'analisi morfometrica del

tessuto, espressa quantitativamente attraverso l'indice di sclerosi (Fig.8, pannello centrale). All'osservazione al TEM, i fibroblasti dei tessuti prelevati dagli animali infartuati di controllo e dagli animali appartenenti al gruppo 3 apparivano come cellule attivate, ricche nel loro citoplasma di RER e con un apparato di Golgi molto sviluppato; in corrispondenza della superficie esterna della loro membrana plasmatica erano ben evidenti siti di assemblaggio e giustapposizione di microfibrille collagene. Anche la matrice extra-cellulare (ECM) era caratterizzata dalla presenza di numerose ed estese fibre collagene. Negli animali del gruppo 2 e del gruppo 4 i fibroblasti apparivano invece per lo più come cellule quiescenti e la ECM conteneva meno fibre collagene e più sottili (Fig.8, pannello inferiore) rispetto agli animali di controllo.

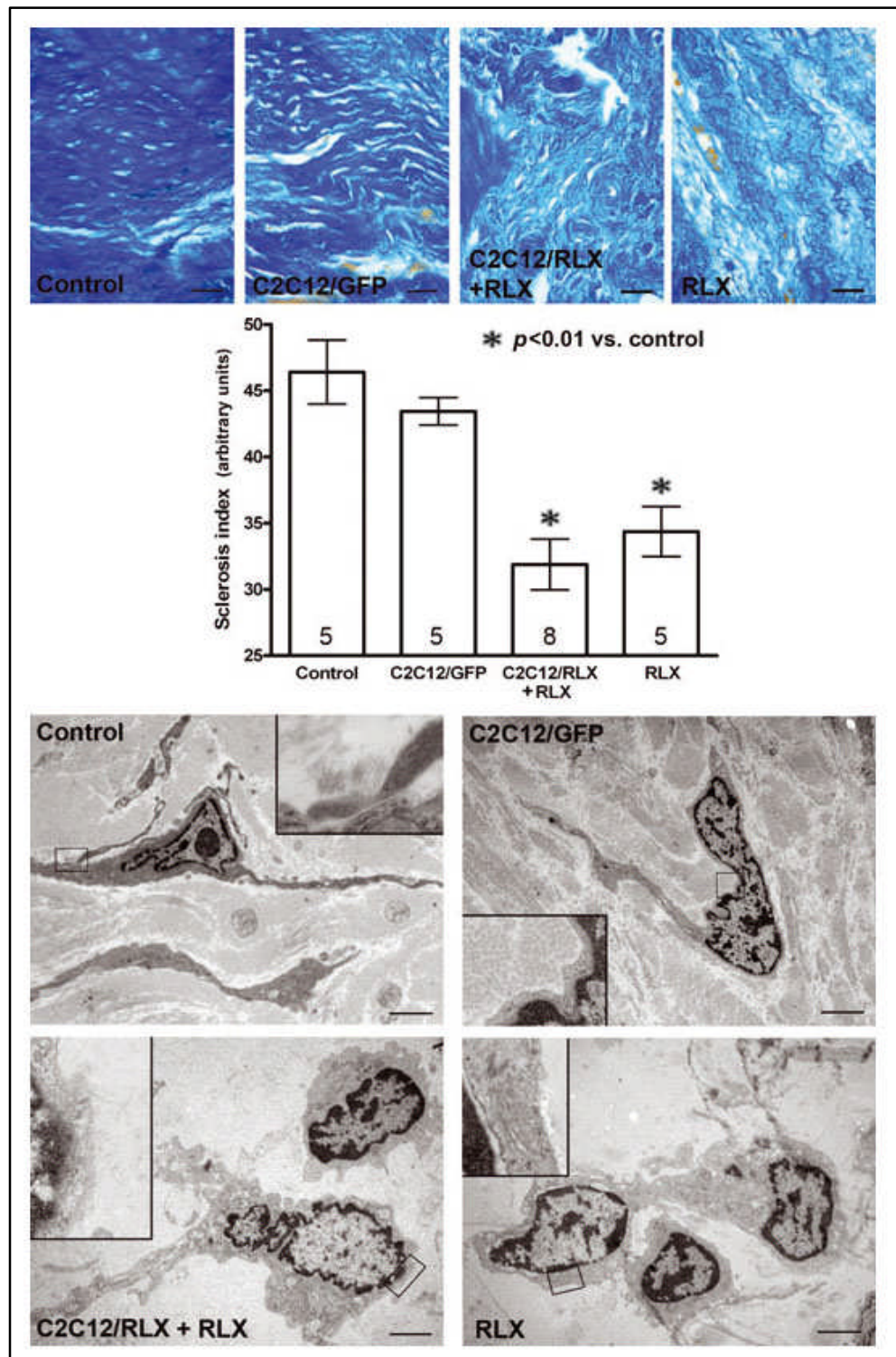


Fig.8 Caratteristiche strutturali ed ultrastrutturali del tessuto cicatriziale cardiaco

DETERMINAZIONE DELLA DENSITA' MICROVASCOLARE

Per meglio comprendere l'effetto della relassina sulla vascolarizzazione e sulla neoangiogenesi del tessuto cicatriziale, è stata quantificata la MVD. Le sezioni degli animali dei gruppi 2, 3 e 4 mostrano un significativo aumento della MVD rispetto agli animali di controllo, ma senza apprezzabili differenze tra i diversi trattamenti (Fig.9).

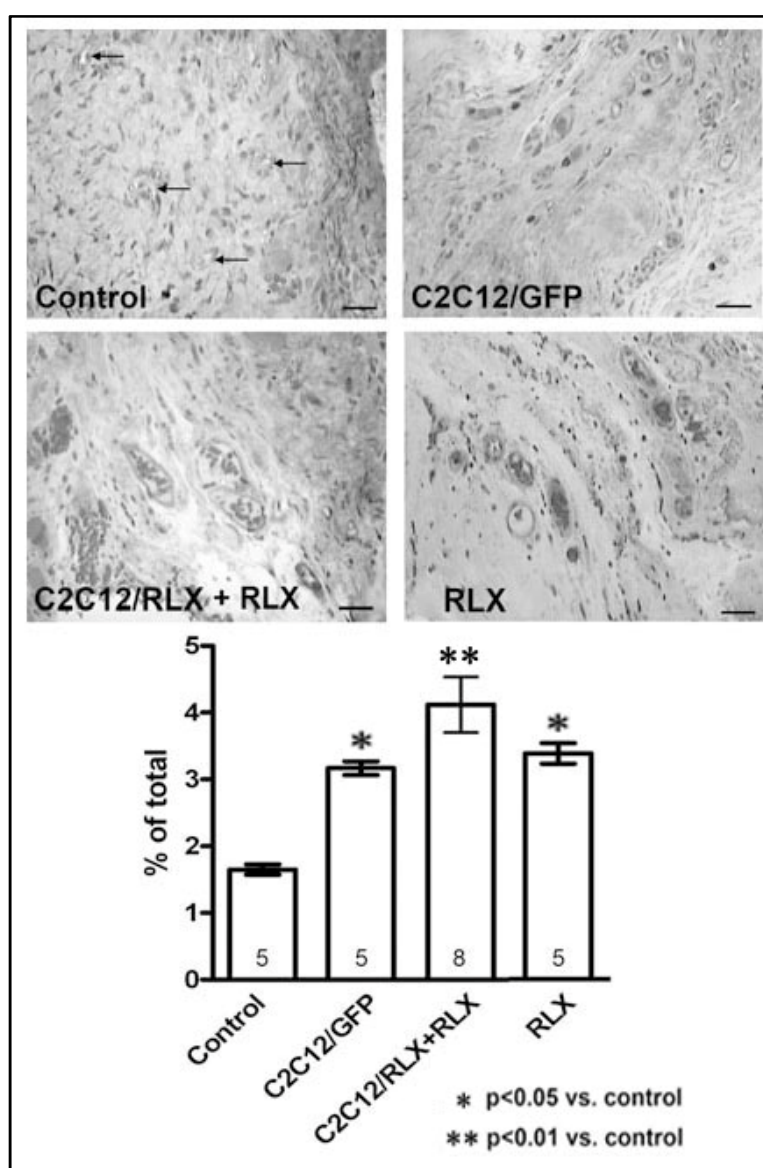


Fig.9 Densità microvascolare

DETERMINAZIONE DEL NUMERO DI CELLULE CARDIACHE IN APOPTOSI E IN PROLIFERAZIONE

Per meglio comprendere i meccanismi alla base del miglioramento funzionale riscontrato negli animali trattati, è stato determinato il numero di cellule ciclanti ed in apoptosi nel tessuto limitrofo alla cicatrice. Il saggio TUNEL ha evidenziato un alto numero di cardiomiociti apoptotici negli animali di controllo, mentre nei ratti trattati, specialmente quelli appartenenti ai gruppi 2 e 4, tale numero era significativamente ridotto (Fig.10).

La reazione immunocitochimica diretta contro Ki-67 ha mostrato che nel tessuto studiato vi è uno scarso numero di cellule in proliferazione, rappresentato essenzialmente da cellule isolate del tessuto cicatriziale e da cellule endoteliali dei microvasi.

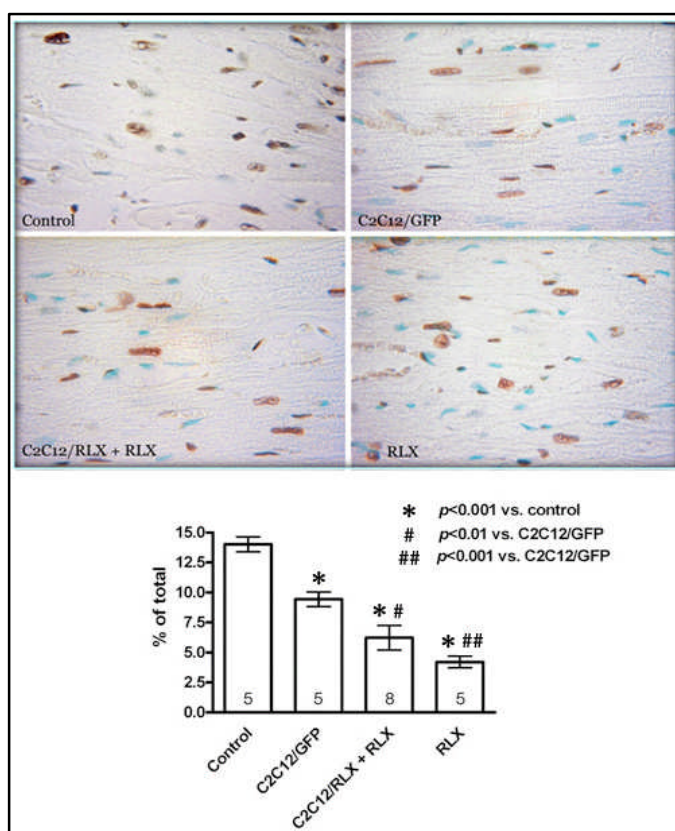


Fig.10 Saggio TUNEL (cellule in apoptosi)

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI PLASMATICI DI RELASSINA

Un mese dopo i trattamenti terapeutici (T2), sono stati dosati i livelli plasmatici di relassina H2 degli animali del gruppo 2 e del gruppo 4, attestati rispettivamente a 75 ± 29 e 82 ± 37 ng/ml. Due mesi dopo il trattamento (T3), i livelli di relassina H2 circolante erano al di sotto della soglia di sensibilità del test in entrambi i gruppi sperimentali.

Discussione

Questo modello di infarto miocardico cronico ha permesso di studiare il rimodellamento a cui va in contro il cuore dopo un evento di ischemia grave, combinando i dati relativi alla *performance* contrattile, ottenuti mediante indagini ecocardiografiche, con i dati sulla vitalità del miocardio, acquisiti mediante analisi PET. Con questo tipo di approccio sperimentale, è stato possibile studiare l'evoluzione del deficit cardiaco e valutare quali benefici avevano apportato i diversi trattamenti.

I risultati delle analisi funzionali ed istopatologiche indicano chiaramente che l'impianto di cellule staminali esogene migliora la *performance* del miocardio ed incrementa la percentuale di sopravvivenza durante il rimodellamento, portando ulteriori elementi a conferma del concetto innovativo, recentemente emerso da indagini condotte in differenti laboratori, che cellule modificate geneticamente possano essere impiantate nel cuore post-infartuato per rilasciare a livello locale molecole ad azione cardiotropica (Gnecchi et al, 2005; Ye et al., 2006; Du 2007).

Questo studio indica inoltre che la relassina, di cui sono ormai noti gli effetti sul rimodellamento del collagene e le proprietà pro-angiogenetiche e vasodilatatorie (Bani-Sacchi et al., 1995; Samuel et al, 2004), svolge un ruolo cardioprotettivo importante nei confronti del rimodellamento cicatriziale post-infarto.

Questo lavoro conferma ed estende i dati ottenuti dalle precedenti ricerche condotte nei laboratori di questo Dipartimento, in cui sono stati studiati gli effetti dell'impianto di cellule C2C12 ingegnerizzate per la produzione di relassina H2 nel cuore post-infartuato di maiale (Formigli et al., 2007). Entrambi gli studi dimostrano infatti che l'impianto di cellule C2C12/RLX, in combinazione con la

somministrazione di relassina esogena, incrementa la neoangiogenesi ed il turn-over della ECM nella fase iniziale del rimodellamento riparativo del ventricolo leso. Il presente studio, oltre a confermare questi risultati anche nel lungo periodo, dimostra per la prima volta che l'*homing* selettivo nel tessuto cicatriziale da parte dei mioblasti impiantati in combinazione con la presenza di relassina locale/circolante si traduce in una aumentata sopravvivenza del tessuto miocardico peri-infartuale.

I nostri dati suggeriscono infatti che la sinergia tra cellule C2C12/RLX, che secernono relassina a livello locale, e pompe osmotiche a rilascio di relassina esogena sembra essere la combinazione che offre i maggiori vantaggi terapeutici. Infatti, la sola somministrazione sistemica dell'ormone, che pure influenza il rimodellamento del collagene rendendo il tessuto cicatriziale meno rigido (Formigli et al., 2007), è in grado di promuovere il miglioramento di alcuni parametri ecocardiografici (FS, LVEDD e MPI) ed istopatologici (IS e densità micro vascolare), ma ha scarsi effetti sulla vitalità del miocardio residuo. Quando invece questa è associata all'impianto di mioblasti C2C12/RLX si assiste anche all'aumento statisticamente significativo del volume di miocardio vitale. Tale effetto sembra esser dipeso, almeno in parte, dall'azione protettiva che la relassina esercita sui cardiomiociti nei confronti dell'apoptosi. Questo concetto è del tutto in linea con la recente osservazione che la relassina ha un effetto anti-apoptotico su cardiomiociti di ratto in coltura (Moore et al., 2007).

Considerando gli effetti che la somministrazione esogena di questo ormone determina in modelli animali di infarto miocardico acuto (Bani et al., 1998; Perna et al., 2005), si potrebbe ipotizzare che, nel modello studiato, il rilascio locale di relassina da parte delle cellule C2C12/RLX abbia un effetto paracrino sul tessuto cardiaco ospite,

favorendone la perfusione e riducendo gli eventi infiammatori locali e la formazione della sclerosi. Attraverso questi meccanismi, la relassina potrebbe quindi promuovere la sopravvivenza ed il recupero funzionale del miocardio peri-necrotico. Non si può tuttavia escludere che i mioblasti esogeni siano in grado di rilasciare altre sostanze cardiotropiche a livello locale, come suggerisce l'osservazione che anche l'impianto di C2C12/GFP incrementa il volume di miocardio vitale e la *performance* cardiaca. Questa ipotesi è supportata da recenti studi, in cui si dimostra che le cellule staminali impiantate in cuore post-infartuato sono in grado di rilasciare fattori pro-angiogenetici e molecole che contribuiscono alla sopravvivenza del tessuto (Unlu e Karapolat, 2008; Hu et al., 2008). Dunque si fa sempre più consistente l'ipotesi "paracrina" per spiegare i benefici funzionali apportati dalla terapia cellulare nel trattamento del cuore post-infartuato (Gnecchi et al, 2005; Caplice, 2006; Berry et al., 2006; Formigli et al., 2007; Du 2007).

I risultati di questo studio indicano inoltre che la tecnica scelta per la somministrazione dei mioblasti, ossia l'immissione nel circolo coronarico per via venosa retrograda, permette l'impianto e la sopravvivenza delle cellule nel tessuto per 2 mesi, con una mortalità degli animali trattati paragonabile a quella dei controlli. Le cellule impiantate si sono localizzate nello spazio peri-vascolare, dove hanno mantenuto le loro caratteristiche di precursori poco differenziati, dimostrando quindi l'incapacità di acquisire il fenotipo cardiaco, come anche riportato in precedenti lavori (Formigli et al., 2007); tale difficoltà nel fare trans-differenziare queste cellule precursori potrebbe dipendere dalla mancanza di giusti stimoli dovuti ad un micro-ambiente cicatriziale non fisiologico (Holterman, 2005). La presenza di un numero maggiore di C2C12/RLX rispetto al numero di C2C12/GFP nel tessuto ospite suggerisce che la

relassina possa promuovere la proliferazione cellulare o, più probabilmente, favorire l'impianto e/o la sopravvivenza delle cellule esogene, rendendo meno ostile il tessuto cicatriziale (Du, 2007).

In conclusione, i risultati di questo studio offrono ulteriore supporto alla tesi che l'impianto di mioblasti esogeni possa migliorare la funzionalità del cuore post-infartuato mediante meccanismi indiretti di tipo paracrino (Rubart e Field, 2006; Caplice, 2006; Du, 2007; Rubart e Field, 2008) e che la relassina, in quanto capace di contrastare il rimodellamento avverso del miocardio, possa essere un buon candidato terapeutico per aumentare l'efficacia della terapia con cellule staminali nel trattamento della disfunzione cardiaca post-infartuale (Haider et al., 2004).

Negli ultimi anni, con la scoperta che il cuore adulto possiede cellule progenitrici nel miocardio vitale peri-infartuale (Muller et al., 2005; Scobioala et al., 2008), si è aperta una nuova prospettiva nel trattamento del deficit cardiaco post-infarto. L'idea di poter riattivare queste cellule ed indirizzarle verso la rigenerazione, ancorché parziale, della porzione di tessuto ventricolare andato distrutto ha indotto i ricercatori a sperimentare nuove strategie per potenziare il differenziamento *in situ* delle cellule progenitrici cardiache autoctone. In questo contesto, la relassina, in quanto ormone cardiovascolare coinvolto nel differenziamento del cuore, potrebbe risultare un buon candidato per questa funzione. Un recente studio *in vitro* condotto nei laboratori del Dipartimento ha infatti dimostrato che la relassina prodotta da mioblasti scheletrici ingegnerizzati C2C12/RLX incrementa i sistemi di comunicazione tra cardiomiociti murini immaturi in coltura e ne aumenta il potenziale differenziativo (Formigli et al., 2009). Sulla base di queste premesse,

è stato progettato uno studio con l'intento di comprendere come la somministrazione dell'ormone influenzi la proliferazione cellulare ed il differenziamento di cellule cardiache immature. Sono state quindi allestite colture primarie di cardiomiociti immaturi isolati da topi neonati, sottoposti poi a trattamento con relassina ed a successivo monitoraggio degli aspetti strutturali e funzionali del differenziamento.

Materiali e Metodi

COLTURE CELLULARI

Sono state allestite colture cellulari primarie di cardiomiociti immaturi da cuori di topi CD1 neonati di 1 giorno. La porzione ventricolare del miocardio è stata sottoposta a disgregazione meccanica e a successiva digestione enzimatica mediante collagenasi di tipo II. La sospensione cellulare così ottenuta è stata centrifugata a 200 *g* per 5 minuti ed il pellet è stato risospeso in terreno di coltura DMEM. Successivamente, le cellule isolate singolarmente o in piccoli gruppi sono state selezionate tramite un filtro di 70 μm e, per la rimozione dei fibroblasti (aderenti), sono state sottoposte ad un pre-plating di 50 minuti su piastre non collagenate. Le cellule non adese sono state centrifugate e seminate in piastre da 6 pozzetti, preventivamente collagenate, contenenti il terreno di coltura DMEM con siero di cavallo (10%) e siero fetale bovino (5%). Le colture cellulari così ottenute erano composte approssimativamente al 96% da cellule muscolari cardiache e al 4% da fibroblasti, come dimostrato mediante immunofluorescenza per la vimentina, marker specifico fibroblastico (Formigli et al., 2009). Dodici ore dopo la semina, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco a cui era stata aggiunta relassina H₂, in concentrazione di 100 ng/ml; precedenti studi hanno infatti dimostrato che tale dose produce effetti biologici in modelli di ischemia/riperfusionne cardiaca sia *in vitro* che *in vivo* (Masini et al., 1997; Perna et al., 2005). Le colture sono state studiate a 2, 12, 24, 48 ore dopo l'aggiunta di relassina nel mezzo. Agli stessi punti sperimentali sono state studiate le colture di cardiomiociti di controllo non trattate con relassina.

ANALISI DEL CICLO CELLULARE MEDIANTE INCORPORAZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA

Per capire come la relassina possa influenzare la proliferazione cellulare, le cellule isolate sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (circa 10^4 cellule per pozzetto) e coltivate in DMEM per 2, 12, 24 e 48 ore con o senza relassina (100 ng/ml). Dopo l'incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con HBSS contenente 18.5 kBq/ml (0.5 μ Ci/ml) di timidina triziata per 1 ora a 37°C. Rimosso il terreno, le colture sono state lavate con soluzione salina di Hank's (HBSS) e il DNA è stato precipitato con TCA 3% freddo ed estratto con 1 ml di NaOH 0,3 M. La radiattività emessa è stata misurata con un beta-counter. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati espressi come dpm/mg di proteine. Sulla base dei risultati così ottenuti, l'incorporazione di timidina triziata da parte dei cardiomiociti immaturi è stata anche valutata mediante isto-autoradiografia. Le cellule isolate sono state coltivate su vetrini copri-oggetto collagenati per 2 e 12 ore in presenza o assenza di relassina (100 ng/ml). Dopo l'incubazione, il mezzo di coltura è stato sostituito con HBSS contenente 18.5 kBq/ml (0.5 μ Ci/ml) di timidina triziata per 1 ora a 37°C. Le cellule sono state poi fissate in Carnoy per 20 minuti ed i vetrini copri-oggetto sono stati lavati in acqua distillata per 12 ore, immersi in emulsione fotografica a 50°C ed asciugati a 20°C, per poi essere incubati al buio per 7 giorni a 4°C. Successivamente i vetrini sono stati immersi in liquido di sviluppo per 8 minuti a 20°C. Le cellule sono state poi controcolorate con ematossilina ed i vetrini montati con montante Eukitt. E' stata calcolata la percentuale di cellule marcate sul numero di

cellule totali, basandosi sull'osservazione di 10 campi microscopici scelti in modo casuale da due distinti osservatori.

ESTRAZIONE DELL'RNA

L'RNA totale è stato estratto tramite TRIzol Reagent e sospeso in acqua DNAsi e RNAsi free. Potenziali contaminazioni da DNA genomico sono state eliminate mediante trattamento con DNAsi (desossiribonucleasi I) prima della reazione di retrotrascrizione (RT). La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state valutate prima e dopo il trattamento con DNAsi, misurando l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm. L'assenza di degradazione dell'RNA è stata accertata tramite elettroforesi su gel di agarosio con bromuro di etidio. L'RNA è stato conservato a -80°C.

REAL-TIME PCR

1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto a cDNA a singolo filamento usando il kit commerciale iScript cDNA Synthesis Kit BIO-RAD. I campioni sono stati incubati a 25°C per 5 minuti, 42°C per 30 minuti e 85°C per 5 minuti; sono stati effettuati controlli negativi omettendo l'enzima o sostituendo il campione con acqua sterile DNAsi- e RNAsi-free, per escludere eventuali contaminazioni da DNA genomico o da RNA. I campioni di cDNA sono stati conservati a -20°C. Sono stati condotti esperimenti di *real-time* PCR quantitativa relativa usando lo strumento ABI Prism 7500 Sequence Detection System in combinazione con reagenti di espressione genica Taqman, consistenti in un set di primer e di una sonda fluorogenica specifica per ogni determinato gene analizzato.

L'espressione dei cinque geni *target* coinvolti nel differenziamento cardiomiocitario è stata quantificata in relazione all'espressione del gene GAPDH, usato come gene di riferimento (HK, *housekeeping*) (Tab.1).

Gene	Fuzione	Codice sonda TaqMan
GATA-4	Fattore trascrizione miogenico	Mm00484689_m1
Nkx2-5	Fattore trascrizione miogenico	Mm00657783_m1
Cx43	Proteina giunzionale gap cardiaca	Mm00439105_m1
cTnT	Proteina sarcomerica cardiaca	Mm00441922_m1
HCN4	Canale del K ⁺ (pace-maker cardiaco)	Mm01176086_m1
GAPDH	Enzima del metabolismo dei carboidrati	Mm99999915_g1

Tab.1 Geni analizzati in Real-Time PCR

Le reazioni di PCR sono state condotte in triplicato tecnico sui campioni di cDNA collezionati, in un volume totale di 20 µl contenenti 10 µl di Taqman Universal PCR Master Mix 2x, 1 µl di Taqman Gene Expression Assays 20x e 9 µl di cDNA, corrispondenti a una concentrazione finale di 50 ng di RNA retrotrascritto. Le condizioni di reazione sono state le seguenti: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto.

Sono stati effettuati controlli negativi, omettendo il template o sostituendolo con i controlli negativi della reazione di retro trascrizione.

I risultati sono stati espressi come valori di Ct, dove Ct rappresenta il ciclo al quale il *plot* di amplificazione supera la soglia e si ha il primo aumento rilevabile di fluorescenza. I valori di Ct sono stati quindi

analizzati con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Tutti i valori sono stati normalizzati sull'espressione del gene HK GADPH.

IMMUNOFLUORESCENZA IN MICROSCOPIA CONFOCALE

Le cellule in coltura cresciute su vetrini copri-oggetto collagenati sono state fissate in paraformaldeide e incubate in una soluzione contenente 0,5% di albumina e 3% di glicerolo in tampone fosfato per 20 minuti; a ciò è seguita una incubazione overnight a 4°C con i seguenti anticorpi primari: anticorpo policlonale di capra anti-GATA-4 (1:50); anticorpo monoclonale di topo anti-connessina 43 (Cx43) (1:200); anticorpo monoclonale di topo anti-troponina T cardiaca (cTnT) (1:100); anticorpo policlonale anti-HCN4 (1:100). La rivelazione dell'immuno-reazione è stata ottenuta usando antisieri secondari anti-IgG di capra o topo, coniugati con il fluorocromo Alexa (1:100).

Sono stati effettuati controlli negativi, sostituendo l'anticorpo primario con siero non immune delle rispettive specie animali. Le cellule sono state esaminate con un microscopio confocale laser Leica TCS SP5 corredato di una sorgente laser HeNe/Argon per misure di fluorescenza.

Sono state effettuate analisi densitometriche dell'intensità di fluorescenza per ciascun marker su 5 diversi campi microscopici selezionati in modo casuale. I valori di densità ottica sono stati espressi come $media \pm SEM$.

ANALISI ULTRASTRUTTURALE

Per lo studio ultrastrutturale, dalle colture di cardiomiociti coltivati per 48 ore in presenza o in assenza di relassina sono stati ottenuti dei

pellet mediante centrifugazione, fissati poi in glutaraldeide 4% e post-fissati in tetrossido di osmio per essere inclusi in Epon 812. L'analisi ultrastrutturale è stata condotta su sezioni ultrafini contrastate con acetato di uranile e sottonitrato alcalino di bismuto. L'osservazione è stata fatta ad un microscopio elettronico a trasmissione Jeol 1010 a 80 kV.

ELETTROFISIOLOGIA

Le caratteristiche elettrofisiologiche dei cardiomiociti sono state studiate mediante la metodica del *patch-clamp* su cellule intere (Formigli et al., 2005; 2009) a 24 e 48 ore dal trattamento. In particolare sono state valutate: *i*) presenza e frequenza dei potenziali di azione ritmici; *ii*) corrente in entrata del Na^+ , I_{Na} ; *iii*) correnti del Ca^{2+} T-type ($I_{\text{Ca,T}}$) e L-type ($I_{\text{Ca,L}}$); *iv*) corrente transiente in uscita del K^+ attivata dalla depolarizzazione, I_{to} ; *v*) corrente in entrata del K^+ , I_{K1} ; *vi*) corrente *pace-maker*, I_{f} . Sono state effettuate registrazioni sia in modalità *voltage-clamp* che *current-clamp*. Il protocollo sperimentale prevedeva che le cellule crescessero in condizioni tali da poter stabilire i fisiologici contatti cellula-cellula, mediati anche da gap-junction, necessari per la maturazione dei cardiomiociti. Soltanto prima dell'inizio della registrazione, al fine di evitare interferenze, le colture sono state trattate con eptanolo (1 mmol/L) per bloccare i collegamenti elettrici tra cellule. Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente in tampone di Tyrode (NT) contenente (mmol/L): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl_2 1.5, MgCl_2 1.2, glucose 5.5, HEPES/NaOH 5).

Per studiare la sensibilità dei canali del Na^+ attivati ad alto voltaggio, è stata usata la tetrodotossina (TTX, 1 $\mu\text{mol/L}$). Una volta sopresse le correnti uscenti del K^+ , gli esperimenti sono stati eseguiti in

tampone contenente (mmol/L): 122.5 NaCl, 2 CaCl₂, 20 TEA-OH, 10 HEPES, 20 tetraetilammonio (TEA). La 4-amminopiridina (2 mmol/L), bloccante selettivo dei canali del K⁺, è stata usata anche per studiare la corrente in uscita del K⁺, I_{to}. Le correnti del Ca²⁺ sono state registrate in soluzione TEA-Ca²⁺, priva di ioni Na⁺ e K⁺, così composta (mmol/L): 10 CaCl₂, 145 TEA bromide, 10 HEPES. E' inoltre stata aggiunta nifedipina (10 μmol/L) per bloccare i canali del Ca²⁺ responsabili della corrente di tipo L. Gli elettrodi contenevano una soluzione sterile così composta (mmol/L): 130 KCl, 10 NaH₂PO₄, 0.2 CaCl₂, 1 EGTA, 5 MgATP, 10 HEPES, a pH 7.2. Le correnti rapide in entrata del Na⁺ (I_{Na}) e del Ca²⁺ sono state evocate con impulsi di 1 s. di voltaggio compreso tra -80 a +50 mV, in incrementi da 10 mV, applicati da un potenziale di partenza (HP) di -90 mV. La corrente del K⁺ (I_{K,tot}), sostenuta dai canali *rectifier* ritardati, è stata evocata, in condizioni di *voltage clamp*, tramite un HP di -60 mV per bloccare le correnti del Na⁺ (I_{Na}) e del Ca²⁺ T-type (I_{Ca,T}) ed in presenza di nifedipina per bloccare la corrente del Ca²⁺ di tipo L (I_{Ca,L}). Il protocollo di stimolazione prevedeva impulsi di 10 mV a partire da un potenziale di -80 a +50 mV. La corrente I_{to} è stata evocata con impulsi di 1 s. di voltaggio compreso tra -40 a +50 mV, applicati da un HP di -60 mV, dopo inattivazione delle correnti I_{Na} e di tipo T del Ca²⁺. La corrente I_{K1} è stata evocata in *voltage-clamp* con impulsi da 100 mV/s, partendo da un HP di -120 a +40 mV. La corrente *pace-maker* I_f è stata evocata iper-polarizzando le cellule con incrementi di 20 mV da -30 a -150. I potenziali d'azione sono invece stati registrati in modalità *current-clamp*. I dati sono stati riportati come densità di corrente (I/C_m) e conduttanza specifica (G/C_m), per permettere il confronto tra registrazioni effettuate su cellule diverse. La corrente di attivazione basale è stata calcolata con la seguente formula:

$$I_a(V) = G_{\max} (V - V_{\text{rev}}) / \{1 + \exp[(V_a - V) / k_a]\}$$

e quella di inattivazione con la formula:

$$I_h(V) = I / \{1 + \exp[-(V_h - V) / k_h]\}$$

dove G_{\max} rappresenta la conduttanza massima per I_a , V_{rev} è il potenziale apparente di reversione, V_a and V_h sono i potenziali che evocano rispettivamente i valori pari alla metà dell'attivazione e dell'inattivazione massimali, mentre k_a e k_h sono fattori legati ai vari scalini di potenziali.

ANALISI STATISTICA

I valori sono stati riportati come media \pm errore standard della media (SEM). Le differenze sperimentali tra le colture trattate con relassina e le colture di controllo ai diversi punti sperimentali sono state valutate mediante il test della t di Student per valori appaiati. I calcoli sono stati eseguiti con il programma di statistica Prism 5.0.

Risultati

L'aspetto microscopico delle colture di cardiomiociti isolati è stato innanzitutto esaminato a 2, 12, 24 e 48 ore mediante microscopia a contrasto di fase. Nelle prime ore di coltura, le cellule appaiono sferiche o poliedriche, prive di battito spontaneo, in accordo con la loro natura di cardiomiociti immaturi. Dopo 12 ore dalla semina, le cellule tendono spontaneamente ad aggregarsi in *cluster*, che si contraggono ritmicamente ed incrementano il loro volume col tempo, come già osservato in precedenti studi (Formigli et al., 2009). Il trattamento con relassina non sembra indurre variazioni morfologiche importanti alle colture, fatta eccezione per la aumentata dimensione dei cluster alle 24 e 48 ore. Questo effetto è dovuto alla capacità dell'ormone di stimolare la proliferazione cellulare nelle prime ore di coltura, come dimostrato dagli esperimenti di incorporazione di timidina triziata (Fig.11, pannello A e B). La relassina infatti incrementa in modo significativo il numero di cellule in ciclo dopo 2 ore di trattamento, ed ulteriormente dopo 12 ore, mentre lo riduce in modo significativo a 24 ore; non sembra invece avere effetti evidenti a 48 ore di trattamento. Anche l'istautoradiografia conferma la capacità dell'ormone di stimolare la proliferazione ai tempi brevi (Fig.11, pannello B): la percentuale di cellule in ciclo aumenta significativamente alle 2 ore (5.4 ± 1.1 vs. 2.3 ± 0.6 nei controlli, $n=10$, $p < 0.02$) ed ulteriormente alle 12 ore (7.4 ± 1.2 vs. 1.7 ± 0.4 nei controlli, $n=10$, $p < 0.001$).

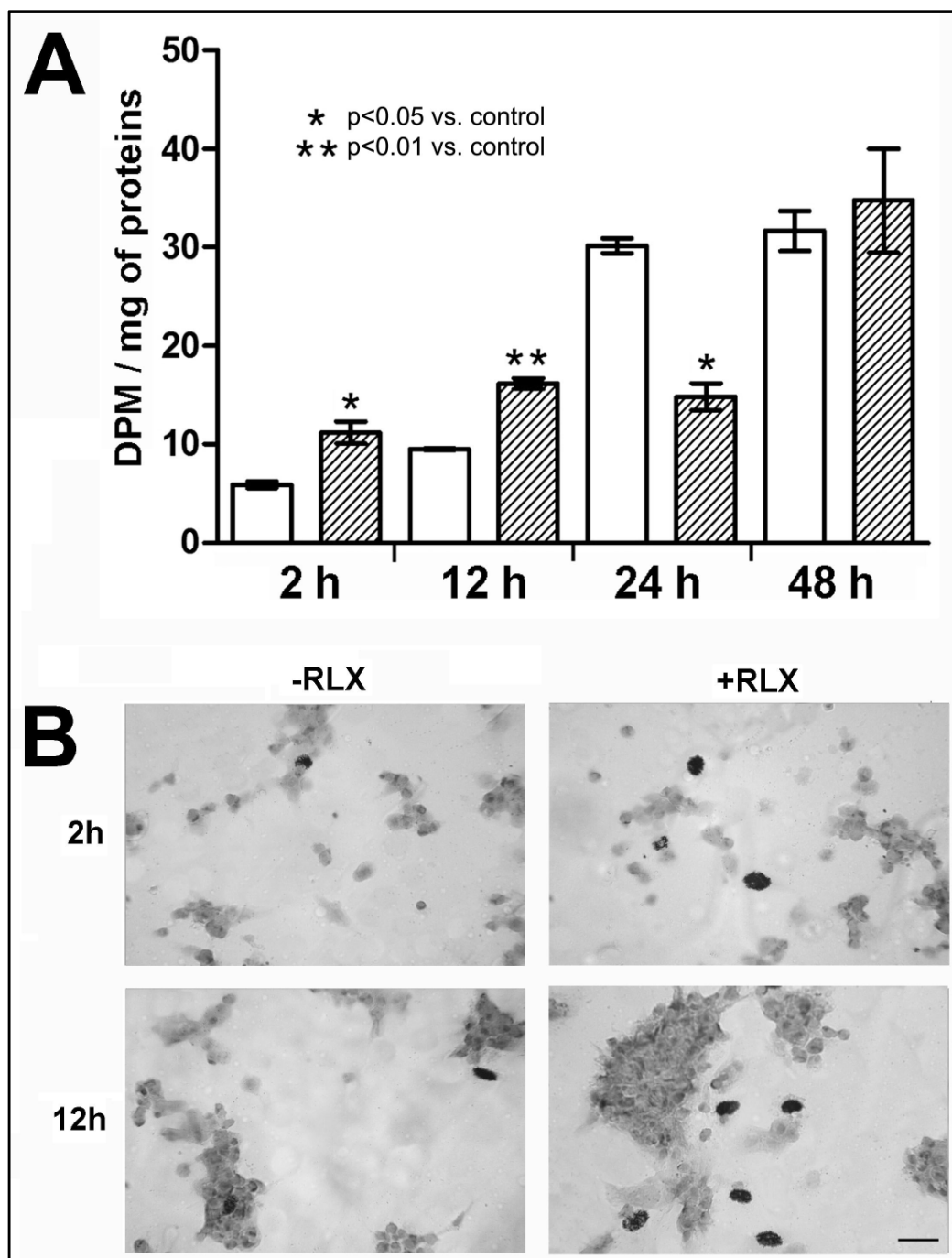


Fig.11 Incorporazione di timidina triziata

REAL-TIME PCR

Gli esperimenti condotti in *real-time* PCR dimostrano che il trattamento con relassina incrementa l'espressione dei geni chiave

coinvolti nel differenziamento cardiomiocitario (Fig.12). In particolare, se comparati con i rispettivi controlli, i trascritti di GATA-4 e Nkx2-5, fattori di trascrizione miogenici indispensabili per l'espressione di specifici geni strutturali cardiaci (Harvey, 1996; Molkenin, 2000), risultano significativamente aumentati dal trattamento con relassina a 24 e 48 ore. A questi tempi vi è dunque un aumento di espressione dei marker differenziativi, concomitante con la riduzione della proliferazione cellulare.

Il trascritto della connessina 43 (Cx43), proteina indispensabile per l'accoppiamento inter-cellulare e per la propagazione degli impulsi elettrici tra cardiomiociti, risulta significativamente aumentato a partire da 24 ore di trattamento con relassina; anche i livelli di mRNA della troponina T (cTnT), tipica proteina sarcomerica, sono aumentati dal trattamento con l'ormone, fino a raggiungere il valore massimo a 48 ore. Il trascritto di HCN4, canale di membrana coinvolto nella corrente *pace-maker* cardiaca I_f (Baruscotti et al., 2010), risulta pure incrementato dalla relassina ad ogni punto sperimentale, con un picco a 24 ore.

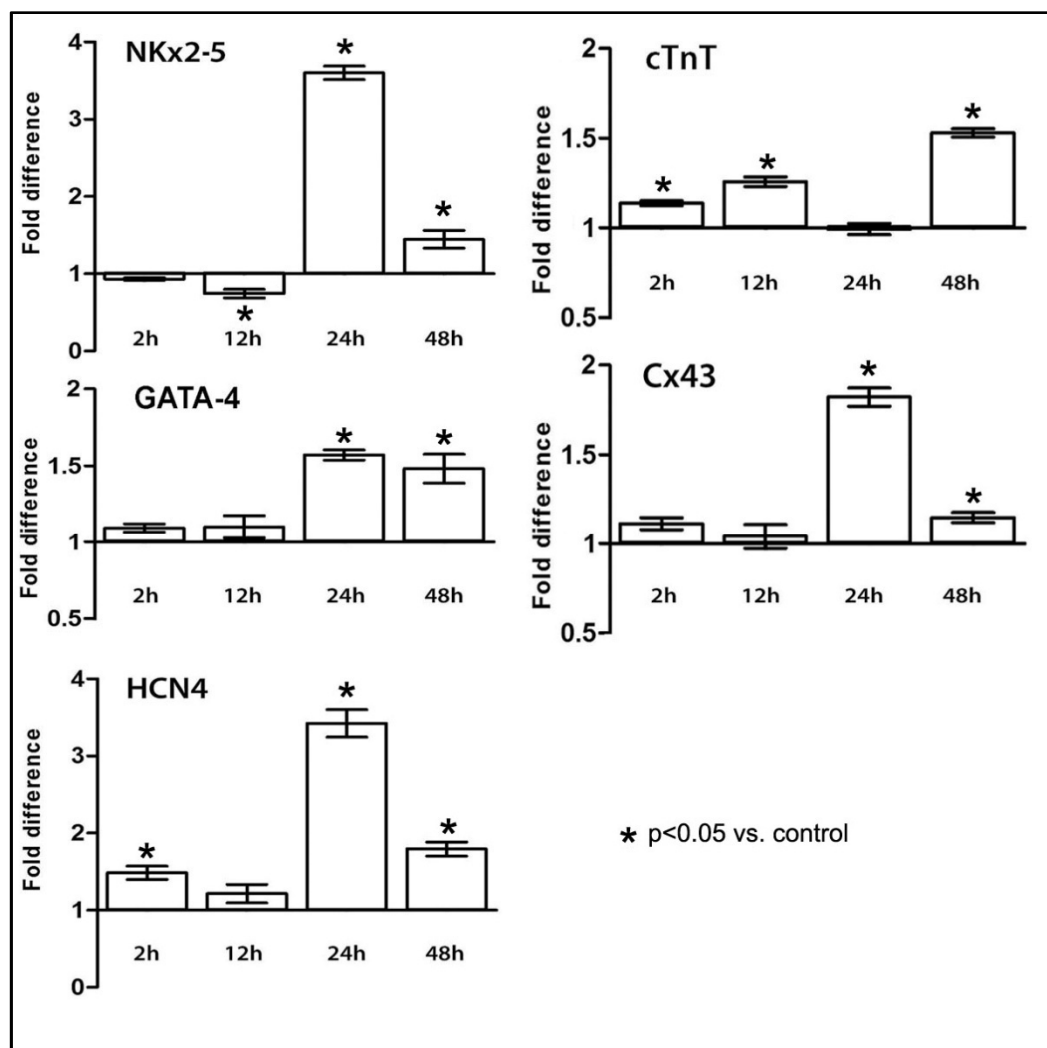


Fig.12 Real-Time PCR: variazione dell'espressione dei geni target

IMMUNOFLUORESCENZA IN MICROSCOPIA CONFOCALE

In linea con i dati ottenuti dagli esperimenti di Real-Time PCR, le indagini di immunofluorescenza in microscopia confocale indicano che il trattamento con relassina induce un aumento nell'espressione di tutte le proteine tipiche del differenziamento studiate, GATA-4, Cx43, cTnT ed HCN4 (Fig.13). In particolare, la proteina GATA-4 è molto espressa nel nucleo e a livelli minori nel citoplasma, suggerendo che essa venga sintetizzata attivamente nel citoplasma e successivamente traslocata nel nucleo.

La quantificazione densitometrica delle immunoreazioni mostra che, dopo 2 ore di incubazione, l'espressione delle proteine in esame non subisce variazioni apprezzabili nelle colture trattate rispetto a quelle di controllo, mentre aumenta in modo significativo dopo 48 ore di trattamento con relassina (Fig.13).

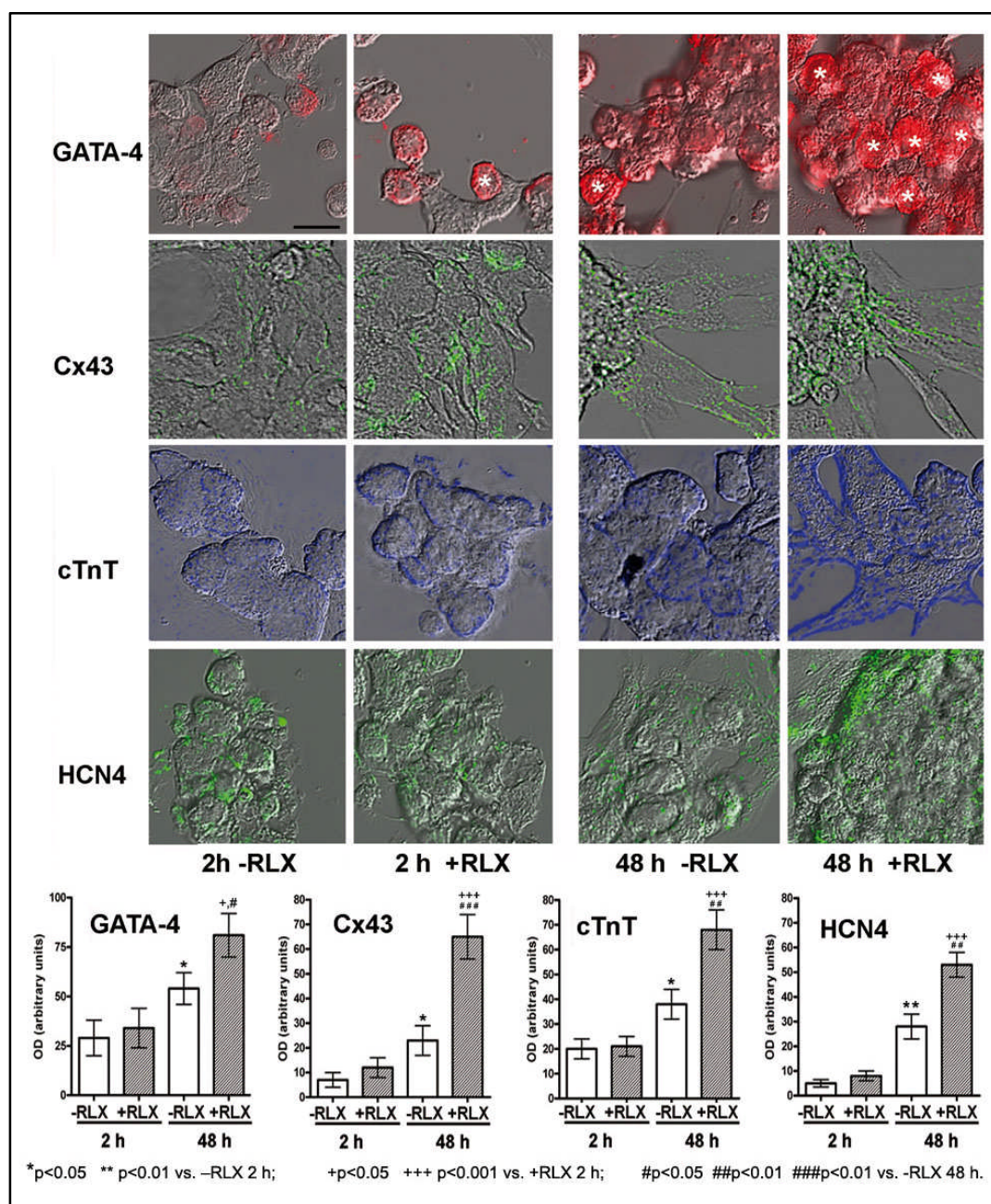


Fig.13 Reazioni di immunofluorescenza e relativa densitometria

ANALISI ULTRASTRUTTURALE

Anche l'analisi ultrastrutturale conferma che la relassina promuove la maturazione dei cardiomiociti. Le cellule cresciute per 48 ore in assenza del trattamento mostrano infatti un citoplasma ricco di poliribosomi liberi, cisterne del RER dilatate, accumuli citoplasmatici di glicogeno e mitocondri di forma tondeggianti (Fig.14, pannello A), tipici di cellule scarsamente differenziate. Al contrario, i cardiomiociti coltivati per 48 ore con relassina mostrano segni di differenziamento in senso miocitario, come i leptomeri, peculiari strutture costituite da bande elettrone-dense perpendicolari a fascetti di filamenti sottili di 5 nm e considerati un fenomeno tipico dell'organizzazione del citoscheletro delle cellule contrattili in via di maturazione (Hosokawa et al., 1994), e gli abbondanti mitocondri ricchi di creste e con matrice elettrone-densa (Fig.14, pannello B). Alcune cellule, ad un grado di maturazione più avanzato, contengono nel loro citoplasma strutture miofibrillari, mitocondri allungati con granuli densi della matrice e giunzioni inter-cellulari con rudimentali dischi intercalari. Tali cellule sono comunque scarsamente rappresentate nelle colture trattate con relassina e non sono mai state riscontrate nelle colture di controllo (Fig.14, pannello C).

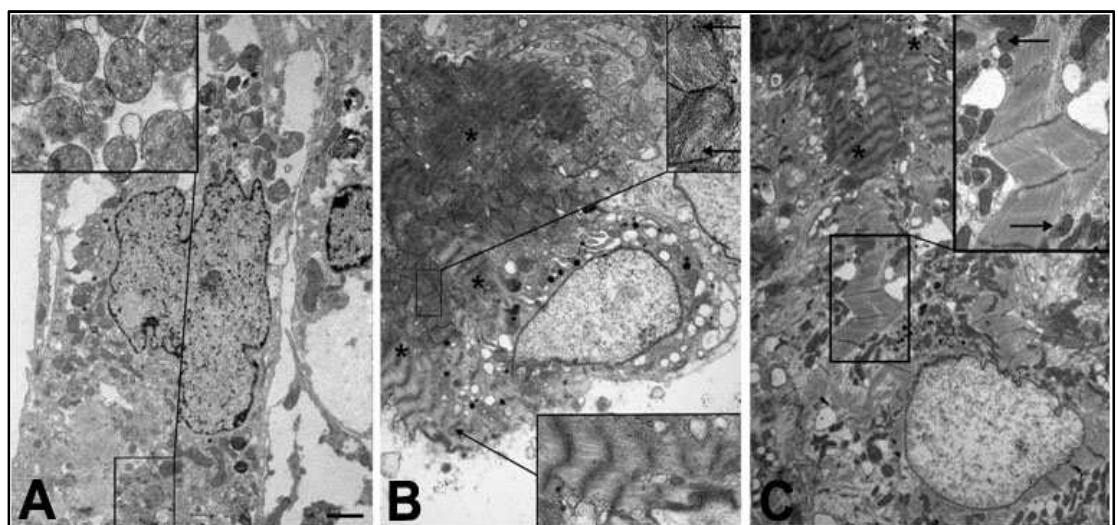


Fig.14 Caratteristiche ultrastrutturali

ELETTROFISIOLOGIA

Una volta osservato che il trattamento con relassina a 24 e 48 ore promuove la maturazione dei cardiomiociti da un punto di vista morfologico, abbiamo indagato se, agli stessi punti sperimentali, le cellule riuscissero ad acquisire anche un fenotipo elettrico funzionale. Le registrazioni effettuate su cellule intere in modalità *current-clamp* hanno evidenziato che i cardiomiociti di controllo a 24 ore sviluppano potenziali d'azione ritmici spontanei, con una lenta depolarizzazione di fase 4 (corrente *pace-maker*), da 61.2 ± 5 a -46 ± 5 mV (Fig.15, pannello A a). Per capire le basi ioniche di questi AP, sono state registrate le correnti di membrana in modalità *voltage-clamp* (Fig.15, pannello B-D): in tali condizioni, i cardiomiociti mostrano: i) una ben evidente corrente in entrata del Na^+ , I_{Na} , nei primi 3-4 ms dell'impulso, che si innesca da una soglia di 49.5 ± 4 mV ed è bloccata da TTX; ii) due correnti del Ca^{2+} che, sulla base della loro dipendenza dal voltaggio e della loro sensibilità alla nifedipina, sono state identificate come tipo T ($I_{\text{Ca,T}}$) e tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$): $I_{\text{Ca,T}}$ è evocata da -60 mV mentre $I_{\text{Ca,L}}$ da -30 mV, con un livello di attivazione e inattivazione più lento (Fig.15, pannello C a, D); iii-iv) correnti del K^+ tipiche dei cardiomiociti maturi (Formigli et al., 2009), tra cui la corrente in uscita rapida transitoria I_{to} (Fig.16, pannello A), bloccata dalla 4-amminopiridina, e la corrente in ingresso del K^+ , I_{K1} (Fig.16, pannello B); v) la corrente *pace-maker*, I_{f} (Fig.16, pannello C a-c). Nonostante la presenza della corrente I_{f} che ben si correla con l'espressione dei canali HCN4, i cardiomiociti oggetto delle registrazioni non possono essere considerati cellule di derivazione del miocardio di conduzione. Infatti, le cellule *pace-maker* vere e proprie mostrano un potenziale di azione (AP) con un basso picco iniziale di voltaggio poiché sono

prive dei canali del Na^+ . Tale caratteristica non è invece presente nei cardiomiociti esaminati.

I cardiomiociti maturano con il passare delle ore di coltura, come dimostrato da: *i*) l'ampiezza del picco del potenziale di azione, che aumenta da 12 ± 3 mV (24 h) a 25 ± 3 mV (48 h; $p < 0.01$); *ii*) la durata del AP, quantificata al 90% della ripolarizzazione, che decresce da 128 ± 13 ms. (24 h) a 105 ± 10 ms. (48 h; $p < 0.05$); *iii*) la frequenza del battito, che passa da 72 ± 9 (24 h) a 110 ± 15 battiti/min (48 h; $p < 0.01$). Inoltre, a 48 h, end-point dell'esperimento, i cardiomiociti mostrano un aumento della capacità di membrana (C_m), indice indiretto dell'incremento di volume cellulare (Tab.2), delle correnti I_{Na} , $I_{\text{Ca,T}}$ e $I_{\text{Ca,L}}$, delle conduttanze G_{Na} , $G_{\text{Ca,T}}$ and $G_{\text{Ca,L}}$ (Fig.15, pannello B-D, Tab 2) e dell'ampiezza delle correnti I_f , I_{to} and I_{Kl} (Fig.16, pannello A-C; Tab.2).

E' importante sottolineare che i cardiomiociti trattati con relassina, rispetto ai relativi controlli, mostrano un significativo aumento dei valori delle correnti I_{Na} , $I_{\text{Ca,T}}$ e $I_{\text{Ca,L}}$, delle conduttanze G_{Na} , $G_{\text{Ca,T}}$ e $G_{\text{Ca,L}}$ (Fig.15, pannello B b, C b, D; Tab.2) e dell'ampiezza delle correnti I_f , I_{to} e I_{Kl} (Fig.16, pannello A-C; Tab.2), nonché un significativo aumento della capacità di membrana (Tab.2).

La relassina modifica inoltre la sensibilità delle correnti I_{Na} e $I_{\text{Ca,L}}$ al voltaggio, con valori di V_a verso potenziali più negativi e valori di K_a diminuiti. Infine, rispetto ai relativi controlli, i cardiomiociti trattati con relassina mostrano un battito spontaneo con frequenza maggiore, che aumenta a 120 ± 12 (24h; $p < 0.01$) e fino a 140 ± 14 battiti/min (48h; $p < 0.01$) (Fig.15, pannello A b), attribuibile all'effetto cronotropo positivo della relassina (Thomas et al., 1993).

Un'attenta analisi dei risultati elettrofisiologici descritti indica che la relassina è in grado di promuovere la maturazione dei cardiomiociti verso il fenotipo ventricolare.

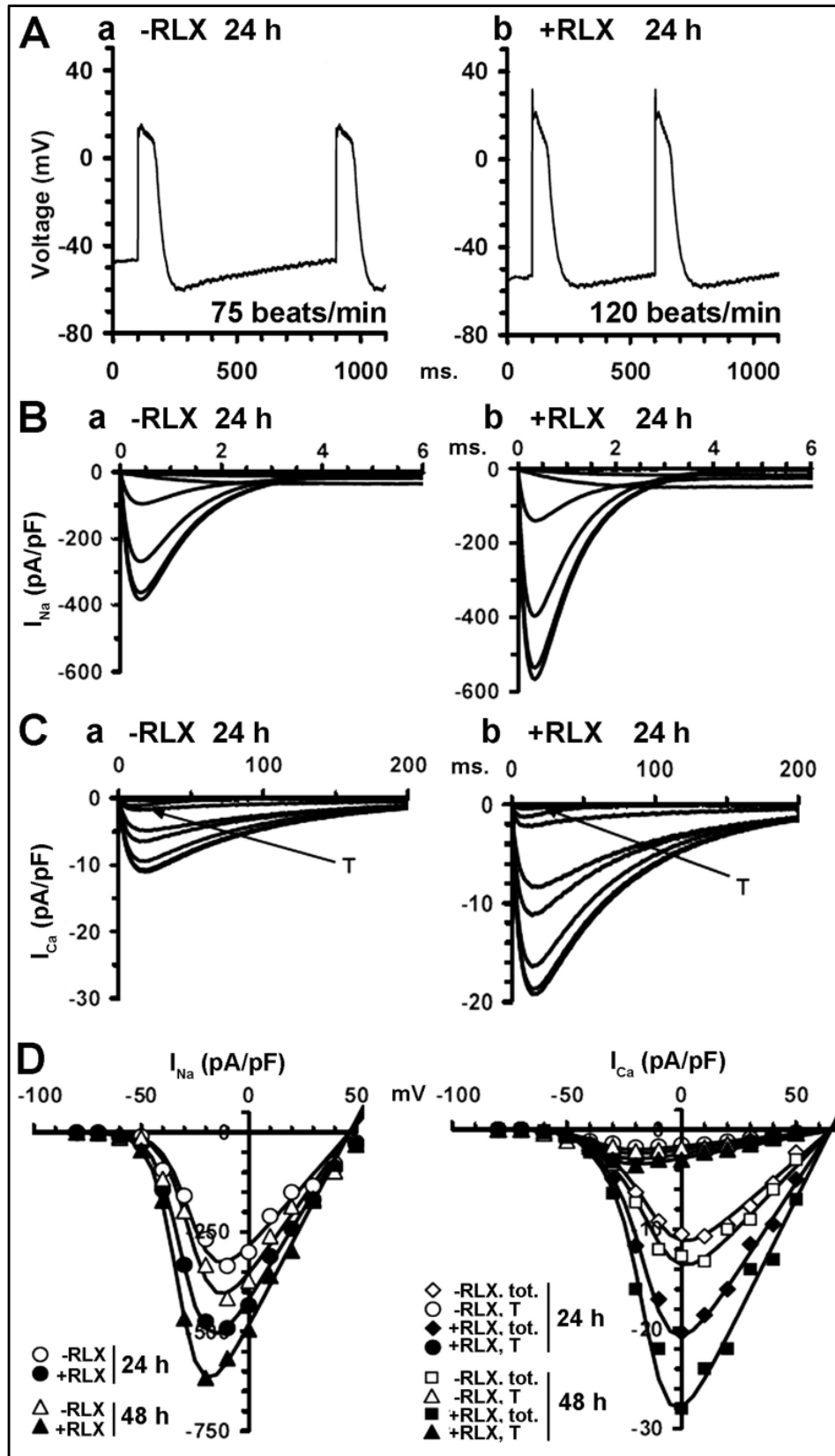


Fig.15 Analisi elettrofisiologiche

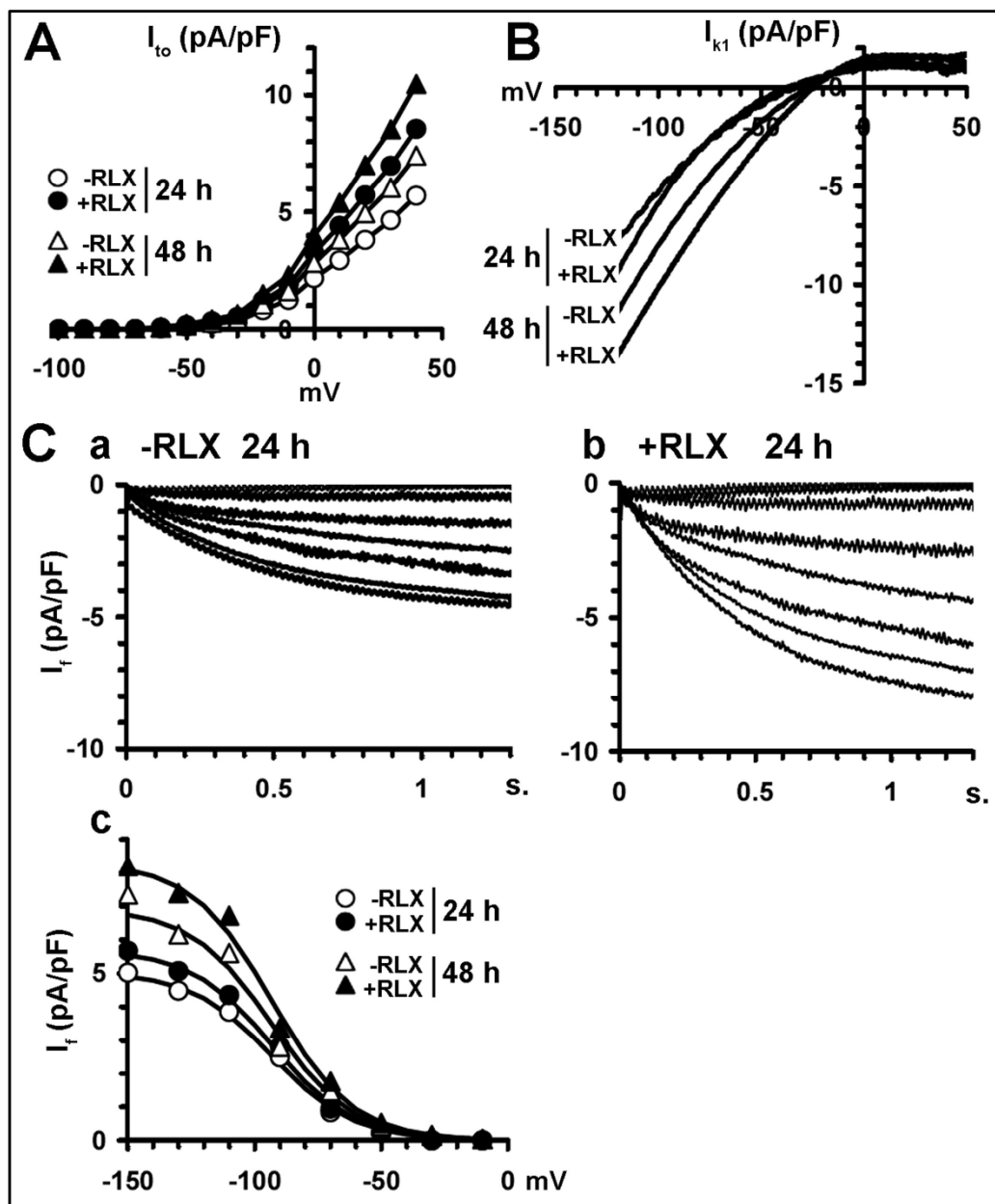


Fig.16 Analisi elettrofisiologiche

Correnti	Parametri	-RLX (24h)	+RLX (24h)	-RLX (48h)	+RLX (48h)
	C_m (pF)	58±5	75±8	95±8	118±12
I_{Na}	I_p (pA/pF)	325±30	500±55	400±42	620±61
	G_m (nS/pF)	4.5± 0.3	8.1±0.6	5.1±0.4	9.8±0.9
	V_a (mV)	-26.1 ± 2.1	-27.2 ± 2.8	- 27.5±2.7	-30.3±3.1
	K_a (mV)	6.4 ± 0.4	6.2±0.4	6.2±0.4	5.7±0.4
	V_r (mV)	47.4 ± 4	47.0 ± 4	48.6 ± 4	47.1 ± 5
$I_{Ca,T}$	I_p (pA/pF)	2.0 ± 0.2	2.9±0.3	2.4±0.2 §	3.5±0.3
	G_m (pS/pF)	20.1± 2.1	30.1 ± 2.4	20.3±2.1	40.2±3.3
	V_a (mV)	-37.0 ± 3.6	-36.7± 3.8	- 36.5±3.2	-37.2±4.2
	K_a (mV)	7.1 ± 0.5	6.9±0.5	6.9±0.5	6.6±0.5
	V_r (mV)	68.4 ± 5	67.1 ± 4 ±	69.1 ± 4	67.7 ± 4
$I_{Ca,L}$	I_p (pA/pF)	8.1±0.8	16±1.2	11±0.9	25±1.6
	G_m (pS/pF)	100 ± 10.3	159.7 ± 15.5	150.2±12 .2	251.3± 20.2
	V_a (mV)	-11.8 ± 1.1	-13.2 ± 1.2	- 13.2±1.2	-14.6±1.2
	K_a (mV)	7.5 ± 0.6	6.9 ± 0.5	7.1±0.6	5.9±0.5
	V_r (mV)	69.4 ± 5	67.4 ± 4	68.1 ± 4	69.1 ± 4
I_{to}	$I_{to,50}$ (pA/pF)	5.6±0.5	8.3±0.7	7.1±0.6	11±0.9
I_{K1}	$I_{K1,-120}$ (pA/pF)	7.5±0.6	9.5±0.8	11.4±0.9	13.5±1.1
I_f	$I_{f,-150}$ (pA/pF)	5.0±0.3	5.5±0.3	6.8±0.5	8.1±0.6
	G_m (pS/pF)	33.6 ± 3.5	38.5 ± 4.2	46.2 ± 3.8	55.4± 4.4
	V_a (mV)	-93.1 ± 9.3	-92.2 ± 9.4	-92.2 ± 8.4	-92.2 ± 8.4
	K_a (mV)	16.4 ± 0.3	16.1 ± 0.4	16.1 ± 0.4	15.6 ± 0.4

Tab.2 Analisi elettrofisiologiche

Discussione

La conoscenza dei fattori endocrini/paracrini alla base della crescita e del differenziamento dei precursori cardiomiocitari è di fondamentale interesse, sia per comprendere i meccanismi fisiologici coinvolti nello sviluppo del miocardio, sia per identificare e validare nuove strategie terapeutiche per il trattamento dello scompenso cardiaco. Questo studio *in vitro* dimostra che la relassina agisce sui cardiomiociti immaturi, che esprimono il recettore RXFP1 (Formigli et al., 2009), modulandone la proliferazione e promuovendone la maturazione. Sulla base di queste nozioni si può quindi ipotizzare che la relassina, di cui il miocardio è sia produttore che organo bersaglio, svolga un ruolo di regolatore endogeno della morfogenesi durante lo sviluppo embrionale e partecipi alla rigenerazione e riparazione del cuore adulto, sia come fattore endogeno, sia come possibile farmaco cardiotropico.

Questo studio dimostra che la relassina modula in modo bifasico la crescita dei cardiomiociti, promuovendola a 2 e 12 ore ed inibendola invece a 24 ore, proprio in corrispondenza del picco nell'espressione dei marker di differenziamento in senso miocardico. Alle 48 ore, quando i cardiomiociti hanno raggiunto un grado di maturità più avanzato, il trattamento con l'ormone non produce effetti apprezzabili sulla proliferazione cellulare.

Questo particolare comportamento della relassina è pienamente in accordo con l'ipotesi che l'ormone possa agire da regolatore fisiologico del differenziamento per le cellule cardiache, favorendo inizialmente l'espansione dei precursori indifferenziati e promuovendone in una fase successiva la maturazione verso un fenotipo funzionale. Un effetto bifasico analogo indotto dall'ormone

è stato altresì osservato in esperimenti *in vitro* su colture di cellule MCF-7 di adenocarcinoma mammario, in cui l'inibizione della proliferazione era associata all'acquisizione di un fenotipo maggiormente differenziato (Bani-Sacchi et al., 1994; Bani et al., 1995).

Gli effetti della relassina sulla maturazione dei cardiomiociti sono associati all'attivazione dei tipici fattori di trascrizione del muscolo cardiaco, GATA-4 e Nkx2-5, indispensabili per l'espressione di specifici geni strutturali miocardici durante lo sviluppo (Harvey, 1996; Molkenin, 2000). Oltre che nella regolazione della crescita e del differenziamento, GATA-4 e Nkx2-5 sembrano esser implicati anche nella sopravvivenza cellulare, in quanto associati ad un fenotipo anti-apoptotico (Toko et al., 2002; Suzuki et al., 2004).

Anche se il presente studio non affronta specificamente questo problema, si può ipotizzare che la stimolazione dell'espressione di GATA-4 e Nkx2-5 indotta nei cardiomiociti dalla relassina, oltre a favorire il reclutamento di precursori immaturi coinvolti nella riparazione cardiaca, possa anche aumentarne la resistenza alle condizioni ambientali sfavorevoli del miocardio post-infartuato, migliorando così la loro potenzialità rigenerativa. In questo contesto, è importante ricordare che la somministrazione esogena di relassina incrementa il volume di miocardio vitale in modelli animali di ischemia-riperfusion (Bani et al., 1998; Perna et al., 2005) ed il rilascio di relassina da parte dei mioblasti esogeni C2C12/RLX geneticamente modificati favorisce il loro impianto e la loro sopravvivenza nel cuore post-infartuato di maiale (Formigli et al., 2007) e di ratto.

Da questo studio, inoltre, emerge che anche l'espressione di geni miocardici posti sotto il controllo dei fattori di trascrizione GATA-4 e Nkx2-5, quali cTnT, HCN4 e Cx43, risulta significativamente

aumentata nelle cellule trattate con relassina rispetto ai relativi controlli. Inoltre, la presenza dell'ormone nel mezzo di coltura favorisce l'acquisizione da parte delle cellule in coltura delle caratteristiche ultrastrutturali tipiche del differenziamento in senso muscolare striato, come i mitocondri a bastoncino, i leptomeri e le miofibrille.

La Cx43 è una proteina indispensabile per la formazione delle strutture intercellulari di collegamento tra cardiomiociti adiacenti, necessarie per la rapida propagazione degli impulsi elettrici (Duffy et al., 2006; Jansen et al., 2010) come anche per il trasferimento di Ca^{2+} e di altri segnali implicati nella regolazione della proliferazione cellulare e del differenziamento (Bassel-Duby et al., 2003; Wörsdörfer et al., 2008). La relassina potrebbe dunque influenzare la proliferazione ed il differenziamento dei cardiomiociti anche tramite l'aumento dell'espressione di questa proteina.

La Cx43 è inoltre coinvolta nell'adattamento cellulare all'ischemia (Lin et al., 2008) e la sua stimolazione favorisce l'impianto e la sopravvivenza delle cellule staminali nel cuore post-infartuato (Lu et al., 2009). Queste ultime scoperte forniscono dunque un'ulteriore indizio a suffragio dell'ipotesi che la relassina protegga i precursori residenti dei cardiomiociti dalle condizioni sfavorevoli che si creano nel cuore a seguito di un evento ischemico.

Anche i dati elettrofisiologici confermano gli effetti della relassina sulla maturazione dei cardiomiociti: infatti l'aumento indotto dall'ormone sull'espressione di HCN4, un canale di membrana coinvolto nella depolarizzazione ritmica (Hosokawa et al., 1994), ben si correla con la capacità della relassina di indurre la corrente I_f , sostenuta appunto dai canali HCN4. In effetti, l'analisi in *time-course* delle colture cellulari indica che, subito dopo l'isolamento e la semina, i cardiomiociti sono privi di battito spontaneo, caratteristica

che invece acquisiscono entro 12-24 ore di cultura, in concomitanza con il picco di espressione del trascritto di HCN4. Questa osservazione, supportata anche da lavori recentemente pubblicati (Le Menuet et al., 2010), suggerisce che HCN4 sia coinvolto nelle fasi precoci del processo di maturazione e che, una volta terminato il differenziamento, rimanga espresso soltanto nelle cellule *pacemaker*.

Va inoltre sottolineato che le correnti implicate nell'attività elettrica spontanea dei cardiomiociti raggiungono ampiezze (I_{Na} , $I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$, I_f , I_{to} and I_{Kl}) e conduttanze (G_{Na} , $G_{Ca,T}$, $G_{Ca,L}$) maggiori dopo il trattamento con relassina, con un fenotipo elettrico non molto dissimile da quello dei cardiomiociti ventricolari. L'ormone incrementa anche la capacità di membrana (C_m), misura indiretta delle dimensioni cellulari ed ulteriore indizio della progressiva acquisizione di un fenotipo più differenziato.

Nel loro insieme, i dati di questo studio suggeriscono che la relassina, in quanto capace di modulare la crescita e di promuovere la maturazione dei cardiomiociti neonatali, potrebbe avere una rilevanza clinica importante. Recenti studi hanno infatti dimostrato che la relassina è rilasciata nel sangue periferico in pazienti con scompenso cardiaco cronico (Dschietzig et al., 2001; Fisher et al., 2003), osservazione che potrebbe essere interpretata come una risposta adattativa al danno da parte del cuore. Infatti, la relassina possiede effetti inotropi (Kakouris et al., 1992) e proprietà vasoattive e coronaro-dilatatrici (Bani Sacchi et al., 1995; Nistri e Bani, 2005; Bani, 2008) che possono giocare un ruolo nel miglioramento del deficit funzionale del cuore post-infartuato. I risultati del presente studio suggeriscono che l'ormone potrebbe anche promuovere il reclutamento di precursori indifferenziati nel

tentativo di riparare il miocardio leso. Questa ipotesi è particolarmente interessante, se si tiene conto che, in un trial clinico di fase II, la somministrazione di relassina H2 produce effetti positivi in pazienti con insufficienza cardiaca congestizia (Dschietzig et al., 2009; Teichman et al., 2009). E' dunque possibile che, in dosi appropriate e con metodi di somministrazione opportuni, la relassina possa essere impiegata come un valido strumento terapeutico per incrementare la capacita del miocardio - intrinsecamente insufficiente - di auto-rigenerarsi.

Introduzione

La fibrosi polmonare è l'end-point di un'ampia gamma di condizioni infiammatorie del polmone che esitano in distruzione del parenchima e della trama vascolare e d anomala deposizione di collagene nell'interstizio. Istopatologicamente, essa è caratterizzata dalla perdita delle strutture alveolari per i processi apoptotici delle cellule epiteliali ed endoteliali, dall'accumulo di fibroblasti attivati, o miofibroblasti, che sono la principale causa della eccessiva deposizione di matrice extra-cellulare. Tutto ciò porta ad un rimodellamento patologico del parenchima polmonare (Hardie et al., 2009). Di tutte le forme di fibrosi polomonare, la più pernicioso è la fibrosi polmonare idiopatica, la cui prognosi è spesso infausta poiché le terapie sono inefficaci nel prevenire o ritardare l'insorgenza dell'insufficienza respiratoria. I nuovi approcci terapeutici si basano sull'individuazione di target molecolari di specifiche vie di segnalazione attivate durante l'instaurarsi del processo fibrotico, quali quella del TGF- β 1, la principale citochina responsabile della trasformazione delle cellule stromali in miofibroblasti (Gharee-Kermani et al., 2009).

La relassina, ormone pleiotropico capace di rimodellare la matrice extra-cellulare, possiede effetto anti-fibrotico ed anti-infiammatorio (Masini et al., 2004; Samuel et al., 2007). Attraverso l'attivazione del recettore RXFP1, la relassina inibisce la fibrogenesi a diversi livelli (van der Westhuizen et al., 2008): diminuisce la presenza delle cellule infiammatorie nell'organo colpito; contrasta l'influenza dei fattori pro-fibrotici, quali TGF- β 1, la proliferazione dei fibroblasti, il loro differenziamento in miofibroblasti con la conseguente deposizione di collagene; stimola la produzione di MMPs e

contemporaneamente riduce l'attività di TIMPs (Samuel et al., 2007). E' stato dimostrato che, mediante la combinazione di queste azioni, la relassina H2 esercita proprietà anti-fibrotiche in diversi modelli animali di fibrosi (Formigli et al., 2007; Samuel et al., 2007), incluso il polmone (Unemori et al., 1996).

Da un punto di vista farmacologico, tuttavia, la relassina H2 presenta le limitazioni di qualsiasi farmaco biologico di natura peptidica, ovvero la difficoltà di sintesi ed i costi elevati di produzione, la necessità di somministrazione parenterale e la possibilità di suscitare una reazione immunitaria. Nel tentativo di ovviare a tali limiti, è stato recentemente sintetizzato un nuovo oligopeptide, P74, in grado di attivare il recettore per la relassina RXFP1 in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary cells) trasfettate per la sua espressione (Shemesh et al., 2008). Il peptide P74, nominato CGEN25009, ha infatti indotto un incremento dei livelli di cAMP nelle cellule CHO over-esprimenti RXFP1, in modo del tutto paragonabile alla relassina H2 (Shemesh et al., 2009). In collaborazione con gli scopritori, abbiamo quindi inteso caratterizzare ulteriormente il pathway di attivazione del recettore RXFP1 da parte di CGEN25009, sfruttando le cellule THP-1 che esprimono costitutivamente questo recettore. Avuta così la riprova che il CGEN25009 è veramente un agonista recettoriale RXFP1, ne abbiamo indagata l'attività antifibrotica sia *in vitro* su fibroblasti di derma umano (BJ3) con saggi per la determinazione della fibrosi, quali la deposizione di collagene e l'espressione di MMP-2, sia di modelli *in vivo* di fibrosi polmonare indotta nel topo dall'instillazione endobronchiale di bleomicina.

Materiali e Metodi

SINTESI DEL PEPTIDE

Il peptide CGEN25009 (P74) è stato sintetizzato chimicamente con il metodo di sintesi in fase solida e purificato attraverso cromatografia liquida ad alta resa “reversed-phase”. La sequenza del peptide sintetizzato è GQKGQVGPPGAAVRRAYAAFSVGRRAYAAFSV-amide, in cui il residuo di valina sottolineato sostituisce il residuo di cisteina, per prevenire la dimerizzazione spontanea della molecola. La glicina C-terminale è stata sostituita con un amide e l'estremità N-terminale rimane un'amina libera. L'identità del peptide è stata verificata mediante spettrometria di massa e la purezza finale attesta ad un valore maggiore del 90%.

COLTURE CELLULARI

La linea THP1 di monociti umani è stata acquistata dal Centro Substrati cellulari—Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Brescia, Italy). Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 con il 10% di siero fetale di vitello (FCS), 250 U/ml di penicillina e 250 µg/ml di streptomicina. La linea cellulare BJ3 di fibroblasti di derma umano (Hahn et al., 1999) è stata fornita dal Prof. Hahn (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge), mantenuta in DMEM contenente il 15% di FCS ed usata per gli esperimenti fino al quindicesimo passaggio. L'espressione del trascritto per RXFP1 da parte di queste cellule è stata verificata fino al trentatreesimo passaggio in coltura.

ATTIVAZIONE DI cAMP, cGMP E MONOSSIDO DI AZOTO (NO) NELLE CELLULE THP1

Le cellule THP1 sono state seminate in piastre multi-pozzetto alla concentrazione di 4×10^5 cellule/0,5 ml di mezzo di coltura e stimulate con relassina H2 o con CGEN25009 a concentrazioni crescenti: 10 nM, 100 nM e 1 μ M. Queste concentrazioni sono state scelte in quanto precedentemente dimostrato che, a tali dosi, la somministrazione di relassina H2 induce una variazione intracellulare di cAMP nelle cellule THP1 (Bani et al., 2007). Come controllo positivo, è stata usata la forskolina, un attivatore dell'enzima adenilato-ciclastasi, in concentrazione di 100 μ M. La stimolazione con i diversi agenti è stata mantenuta per 15 minuti in presenza di 3-isobutil-1-metilxantina (100 μ M), per inibire l'attività delle fosfodiesterasi. Ogni punto sperimentale è stato eseguito in triplicato tecnico.

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati per 8 minuti a 3400 *g* ed il pellet cellulare ottenuto è stato sospeso in 500 μ l di etanolo freddo al 70% e congelato a -20°C.

Il dosaggio di cAMP e cGMP è stato eseguito con un kit specifico disponibile in commercio. I risultati sono stati riportati in femtomoli di cAMP e cGMP per 4×10^5 cellule ed espressi come $media \pm SEM$.

La valutazione della produzione di NO è stata effettuata nel sovranatante delle colture cellulari THP1 con il metodo di Greiss, misurando l'accumulo di nitriti, prodotto finale stabile del metabolismo dell'NO. In breve, 100 μ l di campione sono stati aggiunti a 100 μ l di reagente di Greiss ed è stata misurata la densità ottica alla lunghezza d'onda di 556 nm. Le concentrazioni di nitriti nei diversi sovranatanti sono state calcolate in rapporto a concentrazioni standard di NaNO₂ disciolte in mezzo di coltura. I risultati sono riportati in nanomoli di nitriti per 4×10^5 ed espressi

come $media \pm SEM$. L'analisi statistica dei valori ottenuti è stata effettuata con il test ANOVA ad una via, usando il software Prism 5.0.

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DI MMP-2 NELLE COLTURE DI FIBROBLASTI DI DERMA UMANO

Le cellule della linea BJ3 sono state utilizzate per valutare gli effetti di CGEN25009 sulla stimolazione di MMP-2, oltre l'espressione indotta dal solo TGF- β 1 (2 ng/ml), come descritto in precedenti lavori (Samuel et al., 2004). Le cellule sono state piastrate ad una densità di 10^5 cellule/pozzetto in una piastra da 12 pozzetti, mantenute in DMEM-FCS (1 ml/pozzetto) e subito stimolate con TGF- β 1 (2 ng/ml), in assenza o presenza di CGEN25009 a 30, 100 e 300 nM e 1 e 3 μ M per 48 ore. Sono state usate come controllo positivo le cellule trattate con TGF- β 1 (2 ng/ml) e relassina H2 (100 ng/ml; 16,8 nM). Terminata la stimolazione, in ogni pozzetto è stato sostituito il mezzo con nuovo terreno privo di siero, contenente lattealbumina idrolizzata, per evitare che il siero interferisse nell'analisi zimografica di MMP-2. Dopo 72 ore, i mezzi condizionati sono stati prelevati e, mediante il saggio di Bradford, sono state dosate le proteine totali.

Per ogni campione è stato diluito 1:100 e 1:125 un volume corrispondente ad una quantità fissa di proteine ed è stato caricato nel gel zimografico (contenente 7,5% di acrilamide e 1 mg/ml di gelatina). La densitometria delle bande di proteolisi indotta da MMP-2 è stata valutata usando lo strumento Calibrated Imaging Densitometer in unione con il software Quantity-One. È stata poi effettuata l'analisi statistica con il test ANOVA ad una via, per valutare se vi erano differenze significative nella funzione di MMP-2 tra i vari trattamenti.

DETERMINAZIONE DELLA DEPOSIZIONE DI COLLAGENE DA PARTE DEI FIBROBLASTI DI DERMA UMANO

Le colture di fibroblasti di derma umano sono state utilizzate anche per verificare l'effetto del composto sulla deposizione di collagene indotta da TGF- β 1, effetto valutato attraverso la quantificazione della idrossiprolina.

Le cellule sono state piastrate ad una densità di 10^6 cellule/pozzetto in una piastra da 6 pozzetti, mantenute in DMEM-FCS (1 ml/pozzetto) e subito stimulate con TGF- β 1 (2 ng/ml), in assenza o in presenza di CGEN25009 a 30, 100 e 300 nM e 1 e 3 μ M per 72 ore. Le cellule trattate con TGF- β 1 (2 ng/ml) e relassina H2 (100 ng/ml; 16,8 nM) sono state usate come controllo positivo. Il composto alla concentrazione di 1 μ M è stato saggiato anche in combinazione con relassina H2 (16,8 nM). Terminati i trattamenti, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state immerse in 0,5 ml di HCl 6M ed idrolizzate a 120°C per 24 ore. Durante questo passaggio, la tripla elica del collagene si è scissa liberando i tre aminoacidi che ne caratterizzano la struttura primaria: glicina, prolina, idrossiprolina. I campioni sono quindi stati liofilizzati e ricostituiti in 30 μ l di HCl 1 M, per renderli stabili. Per ogni campione è stata dosata la quantità di idrossiprolina mediante un adattamento del metodo di Bergman e Loxely (Samuel et al., 1996). I valori di idrossiprolina ottenuti sono stati convertiti in quantità di collagene (espressa in μ g per campione) moltiplicandoli per il fattore 6,94, poiché l'idrossiprolina rappresenta il 14,4% della composizione aminoacidica totale del collagene.

E' stata poi effettuata l'analisi statistica con il test ANOVA ad una via, per valutare se vi erano differenze significative nel contenuto di collagene tra i vari trattamenti.

MODELLO ANIMALE DI FIBROSI POLMONARE E PROTOCOLLI SPERIMENTALI

Il potenziale terapeutico del composto CGEN25009 è stato testato su un comprovato modello *in vivo* di fibrosi polmonare nel topo indotta da bleomicina (Moeller et al., 2008).

Il protocollo sperimentale è in accordo con quanto disposto nella Dichiarazione di Helsinki e nelle raccomandazioni della Comunità Economica Europea (86/609/CEE) a proposito di sperimentazione animale. Tale protocollo è stato approvato dall'apposito comitato etico dell'Università di Firenze.

Topi maschi C57BL/6 di 8 settimane e 25-30 g di peso sono stati anestetizzati con cloralio idrato al 4% ed operati per esporre la trachea, attraverso la quale è stata instillata nelle vie respiratorie bleomicina (0,05 IU in 50 µl di soluzione salina) o soluzione salina. I topi a cui è stata somministrata la sola soluzione salina (non indotti) sono stati usati come controllo negativo degli animali trattati con bleomicina (indotti).

Ai topi indotti è stato somministrato il composto CGEN25009 per via intraperitoneale intermittente o per infusione continua sottocutanea; sono stati effettuati anche gruppi di controllo di animali indotti, che hanno ricevuto il solo veicolo, PBS (controlli positivi). Il giorno dell'operazione è stato assunto come giorno 0 dell'esperimento. La somministrazione di CGEN25009 è avvenuta in due diverse modalità: preventiva, dal giorno 0 per 14 giorni (in concomitanza con lo sviluppo dell'infiammazione polmonare e della fibrosi) o terapeutica, iniziata il giorno 7 e mantenuta per 14 giorni (una volta esaurito il processo infiammatorio acuto, causa primaria della fibrosi). Il trattamento preventivo è stato condotto con tre differenti protocolli su altrettanti gruppi di animali: 1) due iniezioni i.p. al giorno di 100 µg di CGEN25009 in 100 µl di PBS 2) due

iniezioni i.p. al giorno di 20 µg di CGEN25009 in 100 µl di PBS 3) infusione continua di 12 µg al giorno di CGEN25009, mediante mini-pompe osmotiche impiantate sottocute nel dorso dell'animale. Alla fine del trattamento, gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale e sono stati asportati loro i polmoni. Il polmone sinistro di ogni animale è stato fissato in formalina al 4%, incluso in paraffina ed usato per le analisi istologiche ed immunohistochimiche. Il polmone destro è stato congelato e conservato a -80°C per le indagini biochimiche.

VALUTAZIONI ISTOLOGICHE ED IMMUNOISTOCHEMICHE

Sono state fatte sezioni istologiche di 6 µm di spessore dai campioni di polmone inclusi in paraffina. Le colorazioni istologiche ed immunohistochimiche sono state condotte in un'unica sessione di lavoro per ridurre al minimo gli artefatti; successivamente, i preparati microscopici sono stati oggetto di analisi morfometrica. In breve, i campi microscopici, fotografati e digitalizzati con un microscopio provvisto di obiettivo 40x, sono stati scelti in modo casuale e corrispondono ad un'area di 38700 µm². Le valutazioni quantitative sono state effettuate tramite il software ImageJ 1.33, tenendo conto della densità ottica (DO) e dell'area (A) occupata dalle strutture di interesse opportunamente colorate.

Per determinare e quantizzare la fibrosi del polmone, le sezioni sono state colorate con il metodo di Azan per le fibre collagene (Smolle et., 1996), omettendo l'azocarminio e l'orange G per diminuire la colorazione di fondo del parenchima. La misura della DO del blu di anilina delle fibre collagene è stata effettuata dopo aver scelto un'appropriata soglia, per escludere gli spazi occupati dall'aria e l'epitelio alveolare/bronchiale (Formigli et al., 2007). I valori sono

stati riportati come $media \pm SEM$ delle misure della DO di ogni topo (5 immagini per ognuno) dei diversi gruppi sperimentali.

La nitrizzazione dei residui di tirosina, un indice della nitrosilazione delle proteine operata dal perossinitrito formatosi durante la reazione infiammatoria, è stata determinata con reazioni immunostochimiche dirette contro la nitrotirosina (NT) (Masini et al., 2006). Le sezioni di polmone sono state incubate per 12 ore a 4°C con un anticorpo policlonale di coniglio anti-nitrotirosina (1:100), poi con un anticorpo secondario di capra anti-Ig di coniglio coniugato alla biotina (1:200) ed infine con il complesso streptavidina-perossidasi (1:200). Sono stati effettuati controlli negativi per la reazione, omettendo l'anticorpo primario o quello secondario. La misura della DO dell'immuno-marcatura anti-NT è stata effettuata dopo aver scelto un'appropriata soglia, per includere l'intera superficie immunomarcata. I valori sono stati calcolati come $A \times DO \times 10^{-6}$ e riportati in unità arbitraria come $media \pm SEM$ delle misure di ogni animale (5 immagini per ognuno) dei diversi gruppi sperimentali.

Per la morfometria dello spessore dello strato muscolare liscio e per il numero di cellule mucipare caliciformi presenti nei bronchi (iperplasia), due marker di rimodellamento della vie aeree, le sezioni di polmone sono state colorate rispettivamente con ematossilina/eosina e con la reazione PAS per le mucine. Sono stati scelti in modo casuale dei campi microscopici relativi a bronchi di piccole e medie dimensioni. Le misure dello spessore dello strato muscolare liscio dei bronchi sono state effettuate su immagini digitalizzate come precedentemente descritto ed è stata inoltre calcolata la percentuale di cellule PAS-positive sul numero delle cellule epiteliali totali dei bronchi.

Per entrambi i parametri, i valori sono stati riportati come $media \pm SEM$ delle misure di ogni animale (5 immagini per ognuno) dei diversi gruppi sperimentali.

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI MIELOPEROSSIDASI

La mieloperossidasi (MPO) è un indicatore di accumulo di leucociti nel tessuto (Mullane et al., 1985). Per dosare i livelli di MPO, i campioni congelati di polmone sono stati pesati, omogenizzati in 10 $\mu\text{l}/\text{mg}$ di tessuto di PBS 0,2 M a $\text{pH}=6$ con l'aggiunta di inibitori delle proteasi (fenilmetilsulfonyl fluoride 1 mM, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di leupeptina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di pepstatina, 1 mg/ml di Pefabloc SC e 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di aprotinina) e centrifugati a 10.000 g per 30 minuti a 4°C. Nel sovrinatante di ogni campione sono stati dosati sia il livello di MPO mediante un saggio immuno-specifico, sia le proteine totali con il metodo di Bradford. I risultati sono stati espressi come picomoli di MPO per milligrammo di proteine ed i valori riportati come $media \pm SEM$ delle misure di ogni animale dei diversi gruppi sperimentali.

DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI MDA/TBARS

La malonildialdeide (MDA), prodotto finale della perossidazione dei lipidi di membrana ad opera dei radicali liberi dell'ossigeno, è considerata un indicatore affidabile del danno infiammatorio tissutale (Bani et al., 1998). I livelli di MDA, misurata come sostanza reattiva all'acido tiobarbiturico (TBARS), sono stati determinati misurando il cromogeno ottenuto dalla sua reazione con l'acido 2-tiobarbiturico. In breve, 100 mg di tessuto polmonare congelato sono stati omogenizzati in 1 ml di buffer Tris-HCl 50 mM a $\text{pH}=7,4$,

contente KCl 180 mM ed EDTA 10 mM. Ad ogni campione è stato aggiunto 0,5 ml di una soluzione così composta: 0,5 ml di acido 2-tiobarbiturico in 0,05 ml di NaOH e 0,5 ml di HCl al 25%. E' seguita una fase di bollitura per 10 minuti. Una volta raffreddati i campioni, il cromogeno è stato estratto in 3 ml di 1-butanol e la fase organica separata attraverso una centrifugazione a 2000 *g* per 10 minuti. L'assorbanza della fase organica è stata valutata alla lunghezza d'onda di 532 nm. Sono state inoltre dosate le proteine totali mediante il metodo di Bradford. I valori di assorbanza ottenuti sono stati convertiti in nanomoli di TBARS per confronto con una curva standard di 1,1,3,3-tetrametossipropano. I risultati sono stati espressi come nanomoli di TBARS per milligrammi di proteina ed i valori riportati come media±SEM delle misure di ogni animale dei diversi gruppi sperimentali.

ANALISI STATISTICA

Le differenze sperimentali tra i gruppi trattati con il composto CGEN25009 ed i gruppi di controllo (solo PBS) sono state valutate mediante il test ANOVA ad una via e tramite il test della *t* di Student nel caso di un confronto tra gruppi appaiati. I calcoli sono stati eseguiti con il programma di statistica Prism 5.0.

Risultati

ATTIVAZIONE DI cAMP, cGMP E MONOSSIDO DI AZOTO (NO) NELLE CELLULE THP1

L'attività biologica del composto CGEN25009 è stata valutata anche sulle cellule THP1, che esprimono costitutivamente il recettore RXFP1. Precedenti studi hanno dimostrato che la relassina H2 promuove l'attività dell'adenilato ciclasi in queste stesse cellule, attraverso il legame con il recettore RXFP1 (Nguyen et al., 2003; Figuiredo et al., 2006). E' stato inoltre dimostrato che la relassina stimola l'accumulo intracellulare concentrazione-dipendente di cAMP e cGMP, nonché la generazione di NO (Parsell et al., 1996; Baccari e Bani, 2008).

Sono stati analizzati gli effetti di concentrazioni crescenti di CGEN25009 sui livelli di questi secondi messaggeri nelle cellule THP1, usando concentrazioni equimolari di relassina H2 come controllo positivo. Entrambe le sostanze inducono un incremento concentrazione-dipendente di cAMP, cGMP ed NO (Fig.17). Alla concentrazione di 1 μ M, il livello di cAMP indotto dal composto CGEN25009 è stato 16 volte maggiore rispetto al basale, mentre quelli di cGMP e NO rispettivamente 4 e 4,5 volte. Questi dati dimostrano ulteriormente che il composto CGEN25009 attiva il recettore RXFP1, sebbene tale attivazione sia di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella prodotta dalla relassina ad una concentrazione equimolare.

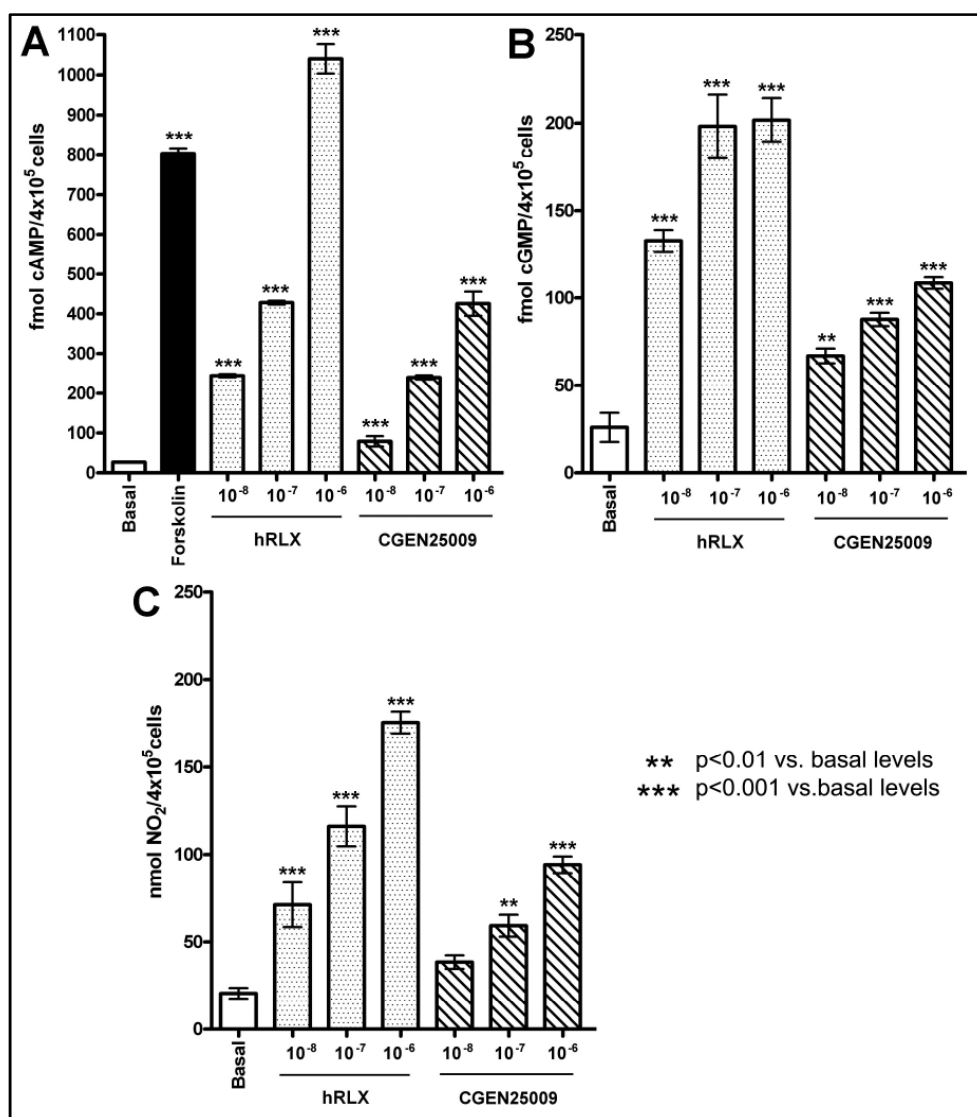


Fig.17 Induzione di cAMP (A), cGMP (B), NO (C) in cellule THP1

ATTIVITA' ANTIFIBROTICA IN VITRO: DETERMINAZIONE DELLA DEPOSIZIONE DI COLLAGENE E DELLA ESPRESSIONE DI MMP-2 DA PARTE DEI FIBROBLASTI DI DERMA UMANO

Per valutare il potenziale anti-fibrotico del composto CGEN25009, è stata valutata la sua capacità di attivare il recettore RXFP1 nei fibroblasti di derma umano, e, attraverso una cascata di eventi, indurre l'espressione di MMP-2 (gelatinasi-A) e la conseguente degradazione del collagene. Sono stati usati fibroblasti della linea

cellulare BJ3, che esprimono costitutivamente il recettore RXFP1 e che precedenti studi avevano dimostrato essere responsivi al trattamento con relassina H2 (Unemori e Amento, 1990; Unemori et al., 1996; Samuel et al., 2004). Controlli positivi sono stati effettuati usando relassina H2 a 100 ng/ml, la concentrazione a cui essa ha mostrato il massimo effetto sull'inibizione della produzione di collagene e sull'aumento dell'espressione di MMP-2 (Unemori e Amento, 1990; Unemori et al., 1996).

Il composto CGEN25009 si è rivelato capace di inibire in modo concentrazione-dipendente la deposizione di collagene indotta da TGF- β 1 (Fig.18, pannello A), mentre non ha mostrato alcun effetto sul livello basale di deposizione di collagene (cellule non indotte con TGF- β 1). L'effetto maggiore del peptide (60% dell'inibizione) si è ottenuto alla concentrazione di 1 μ M, paragonabile a quello ottenuto con relassina H2 16,8 nM.

I livelli di collagene di tutti i gruppi trattati si sono attestati a valori comunque più alti rispetto a quelli misurati nelle cellule di controllo non indotte con TGF- β 1, a dimostrazione del fatto che né la relassina H2, né CGEN25009 riescono ad inibire del tutto la deposizione di collagene delle cellule in coltura dopo 72 ore. Inoltre il trattamento combinato delle due molecole non ha dimostrato effetto sinergico sull'inibizione della deposizione di collagene rispetto al trattamento con il solo CGEN25009 (Fig.18, pannello A), a riprova dell'assunto di partenza che le due molecole attivino lo stesso pathway.

CGEN25009 ha indotto la stimolazione di MMP-2 ben oltre l'effetto del TGF- β 1 da solo (Fig.18, pannello B). La stimolazione massima è stata raggiunta già con la concentrazione minima di CGEN25009, 30 nM, paragonabile a quella ottenuta con la relassina 16,8 nM. L'osservazione che non vi sia una stimolazione dell'espressione di MMP-2 concentrazione-dipendente da parte di CGEN25009 è

conforme a quanto ottenuto valutando l'effetto della relassina H2 nelle medesime condizioni sperimentali.

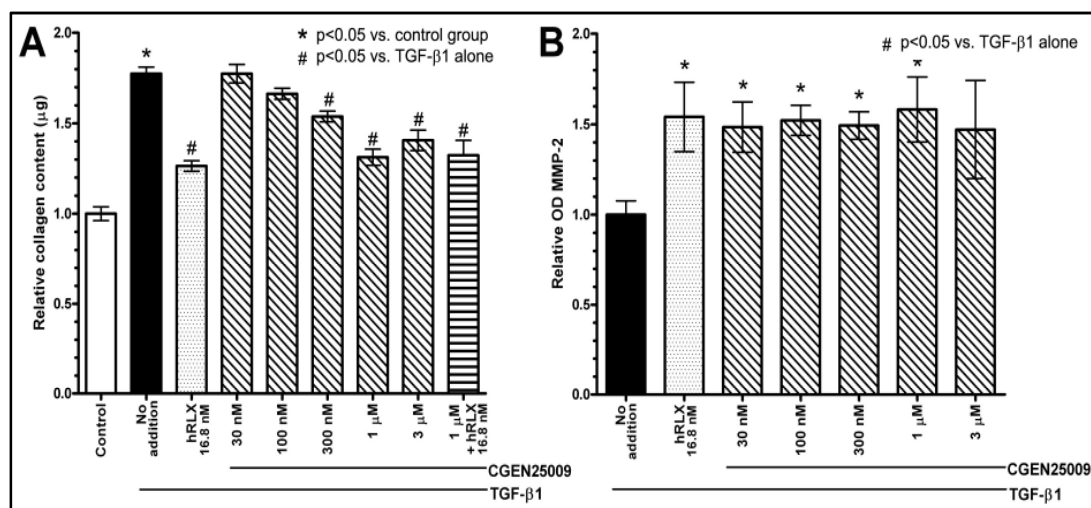


Fig.18 Deposizione di collagene ed espressione di MMP-2

EFFETTI DI CGEN25009 SUL MODELLO ANIMALE DI FIBROSI POLMONARE

La possibile azione terapeutica del composto CGEN25009 è stata valutata in un modello murino di infiammazione e di fibrosi polmonare indotte da bleomicina, già utilizzato per studiare la patogenesi ed il trattamento della fibrosi polmonare (Moeller et al., 2008). Questo stesso modello è stato in precedenza impiegato per dimostrare che la relassina H2 inibisce la fibrosi polmonare (Unemori et al., 1996). La somministrazione di bleomicina per via intra-bronchiale determina infatti l'instaurarsi di una marcata fibrosi, a seguito della reazione infiammatoria sostenuta dall'induzione di citochine pro-infiammatorie, dall'attivazione di macrofagi e granulociti neutrofili e dalla produzione di radicali liberi (Moeller et al., 2008). La fibrosi che si sviluppa è caratterizzata

dall'espressione della citochina pro-fibrotica TGF- β 1, dall'attivazione e proliferazione dei fibroblasti e dall'incremento di deposizione di collagene (Cutroneo et al., 2007). La transizione tra processo infiammatorio e fibrosi sembra essere intorno al 7°-9° giorno dalla somministrazione della bleomicina. (Chaudhary et al., 2006).

Gli effetti del composto CGEN25009 sono stati valutati dopo somministrazione sia preventiva che terapeutica: nel primo caso, il trattamento con CGEN25009, sia per infusione s.c. continua che per somministrazione i.p. intermittente, per 2 settimane a decorrere dallo stesso giorno dell'instillazione di bleomicina determina una forte riduzione della fibrosi polmonare, come dimostra la diminuita densità di collagene nei preparati istologici (Fig.19, pannello A e C), paragonabile a quella presente nei topi non indotti.

Dati analoghi sono stati ottenuti con somministrazione terapeutica del composto, ovvero iniziando al 7° giorno dopo l'instillazione di bleomicina, in concomitanza con la transizione da flogosi a fibrosi (Fig.19, pannello B): il trattamento i.p. intermittente con CGEN25009 alla concentrazione di 2x100 μ g, ha ridotto in modo significativo il livello di fibrosi rispetto ai controlli negativi (PBS). In alcuni casi, il trattamento con CGEN25009 sembra ridurre la deposizione di collagene al di sotto di quella osservata nei topi non indotti (Fig.19, pannello A e B), ma tali differenze non sono significative.

Ulteriori analisi effettuate sui campioni di polmone supportano l'effetto anti-infiammatorio di CGEN25009. In accordo con studi precedenti (Chandler et al., 1983), l'osservazione morfologica dei polmoni dei topi indotti con bleomicina e trattati con il solo veicolo evidenzia un denso infiltrato infiammatorio linfo-monocitario nello stroma perivascolare, peribronchiale e inter-alveolare; tale infiltrato risultava sensibilmente meno evidente nei topi indotti trattati con

CGEN25009; ovviamente, esso era del tutto assente nei polmoni dei topi non indotti (Fig.20). Questi dati suggeriscono che la riduzione della fibrosi indotta dal composto CGEN25009 potrebbe essere dovuta, almeno in parte, ad un suo effetto anti-infiammatorio. Per avere una misura quantitativa dell'infiltrato leucocitario presente nei campioni di polmone, sono stati dosati i livelli di MPO, tipico enzima contenuto nei granuli dei monociti e dei granulociti neutrofilici (Mullane et al., 1985). I livelli di MPO misurati nei polmoni degli animali non indotti sono molto bassi ed incrementano in modo significativo nei topi indotti con bleomicina (Fig.21), in accordo con l'osservazione morfologica (Fig.20); una significativa riduzione dei livelli di MPO è stata dimostrata dopo il trattamento preventivo (Fig.21, pannello A) e terapeutico (Fig.21, pannello B) con CGEN25009, a tutte le dosi indagate e con tutti i protocolli di somministrazione (Fig.21).

Per quantificare l'estensione del danno ossidativo indotto dall'infiammazione, sono stati valutati i livelli di TBARS (Fig.22) e l'espressione di NT (Fig.23), che risultano significativamente più elevati nei polmoni dei topi indotti, rispetto ai non indotti. Il trattamento con CGEN25009 ha ridotto significativamente sia i livelli di TBARS (Fig.22, pannello A e B) che l'espressione di NT (Fig.23, pannello A e B) a tutte le dosi indagate e con tutti i protocolli di somministrazione, sia nel trattamento preventivo che in quello terapeutico, fatta eccezione per l'espressione di NT negli animali trattati con CGEN25009 in modo preventivo alla dose minore (2x20 µg), in cui la diminuzione non raggiunge la significatività statistica (Fig.23, pannello A).

Sono stati poi valutati alcuni parametri istopatologici di rimodellamento bronchiale (Bai e Knight, 2005): i) la percentuale di cellule mucipare caliciformi dell'epitelio bronchiale, che aumenta in

risposta allo stress ossidativo determinando un incremento della produzione di muco; ii) lo spessore dello strato muscolare liscio. Come atteso, entrambi i parametri sono significativamente aumentati nei topi indotti con bleomicina rispetto a quelli non indotti (Fig.24 e 25, rispettivamente). Tale incremento risulta maggiore nei topi sacrificati 14 giorni dopo l'induzione con bleomicina (Fig.24 e 25, pannelli A) rispetto a quelli sacrificati 21 giorni dopo (Fig.24 e 25, pannelli B), a dimostrazione che il rimodellamento bronchiale patologico tende a risolversi spontaneamente dopo circa 2 settimane. La somministrazione di CGEN25009, sia in modo preventivo che terapeutico, a tutte le dosi indagate e con tutti i protocolli di somministrazione, riduce significativamente entrambi i marker di rimodellamento bronchiale (Fig. 24 e 25). Nell'insieme, questi risultati indicano che il composto CGEN25009, somministrato sia in modalità preventiva che terapeutica, mostra importanti effetti benefici nei confronti dell'infiammazione e della fibrosi polmonare indotta da bleomicina.

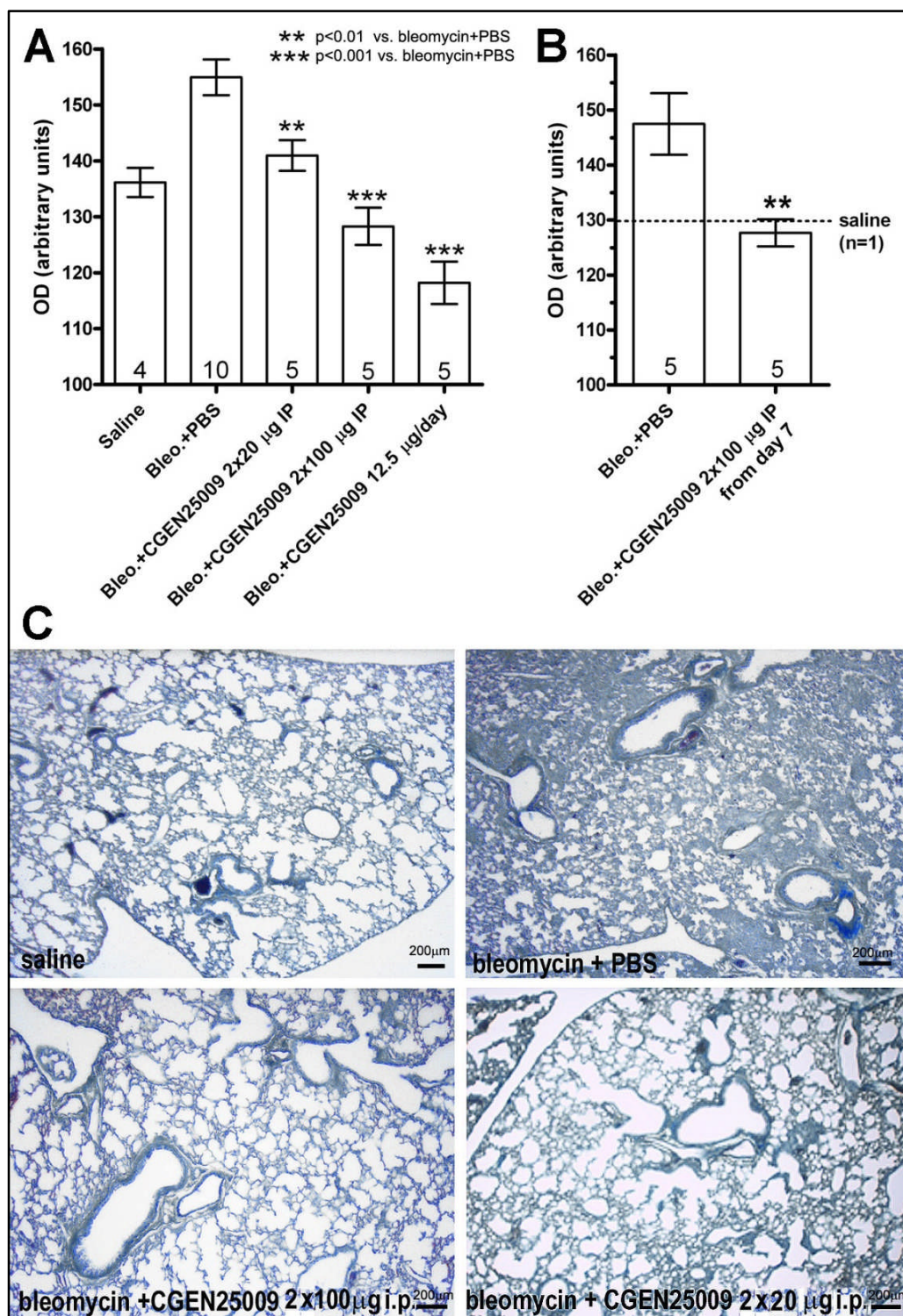


Fig.19 Studi *in vivo*. Deposizione di collagene

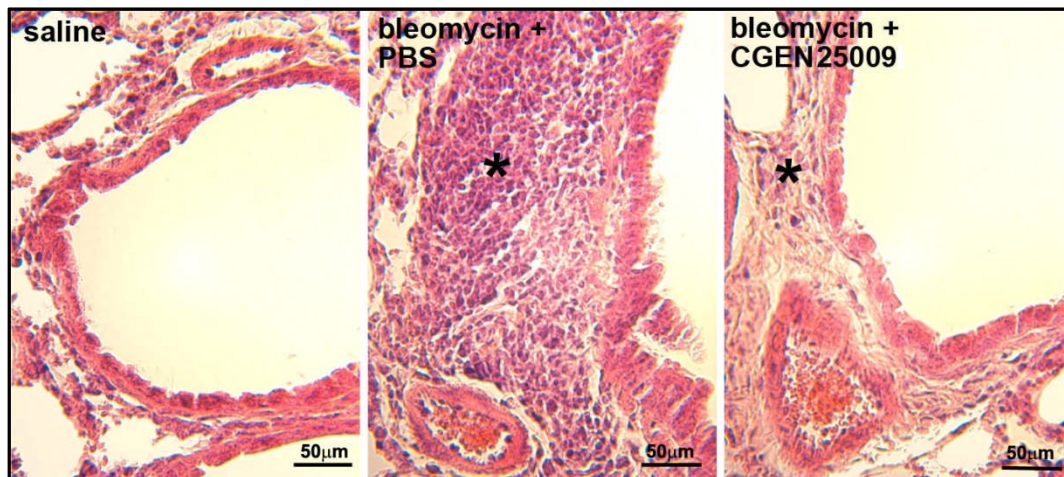


Fig.20 Studi *in vivo*. Morfologia

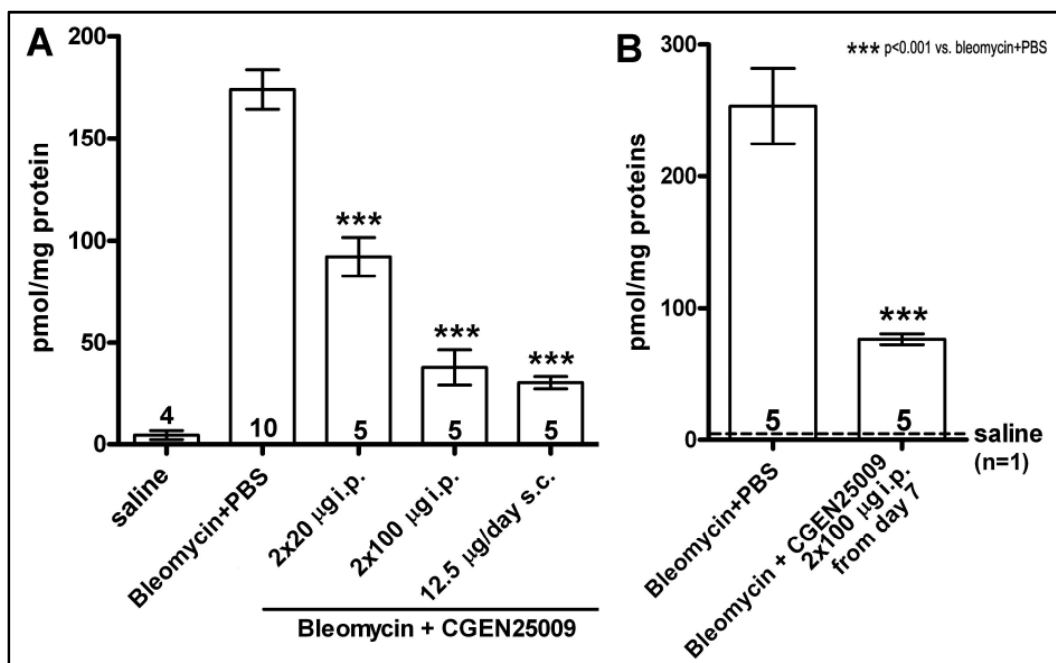


Fig.21 Studi *in vivo*. Livelli di MPO

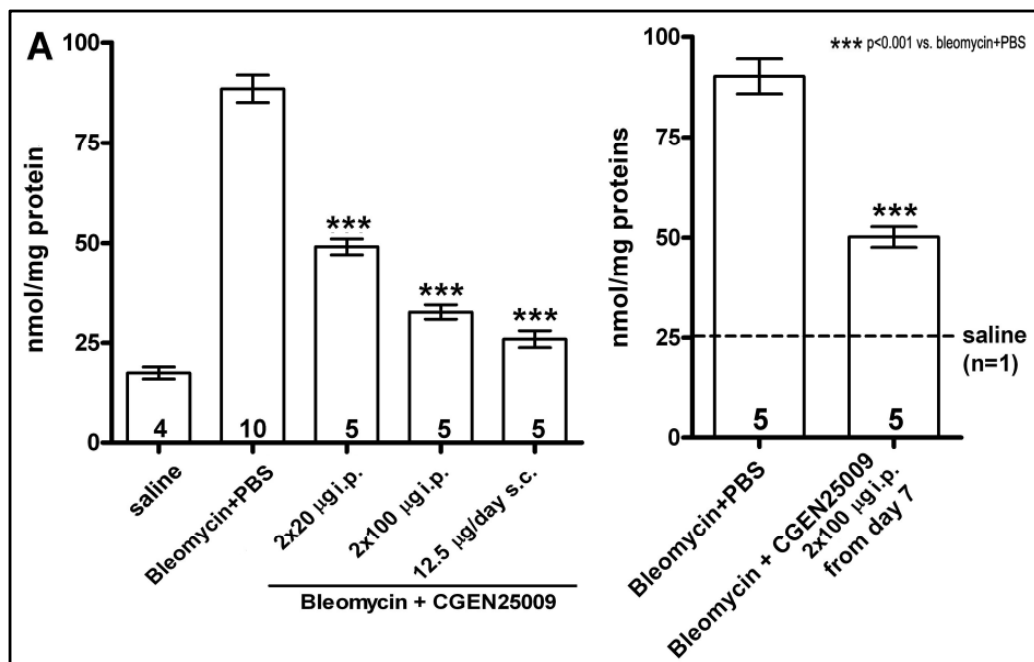


Fig.22 Studi *in vivo*. Livelli di TBARS

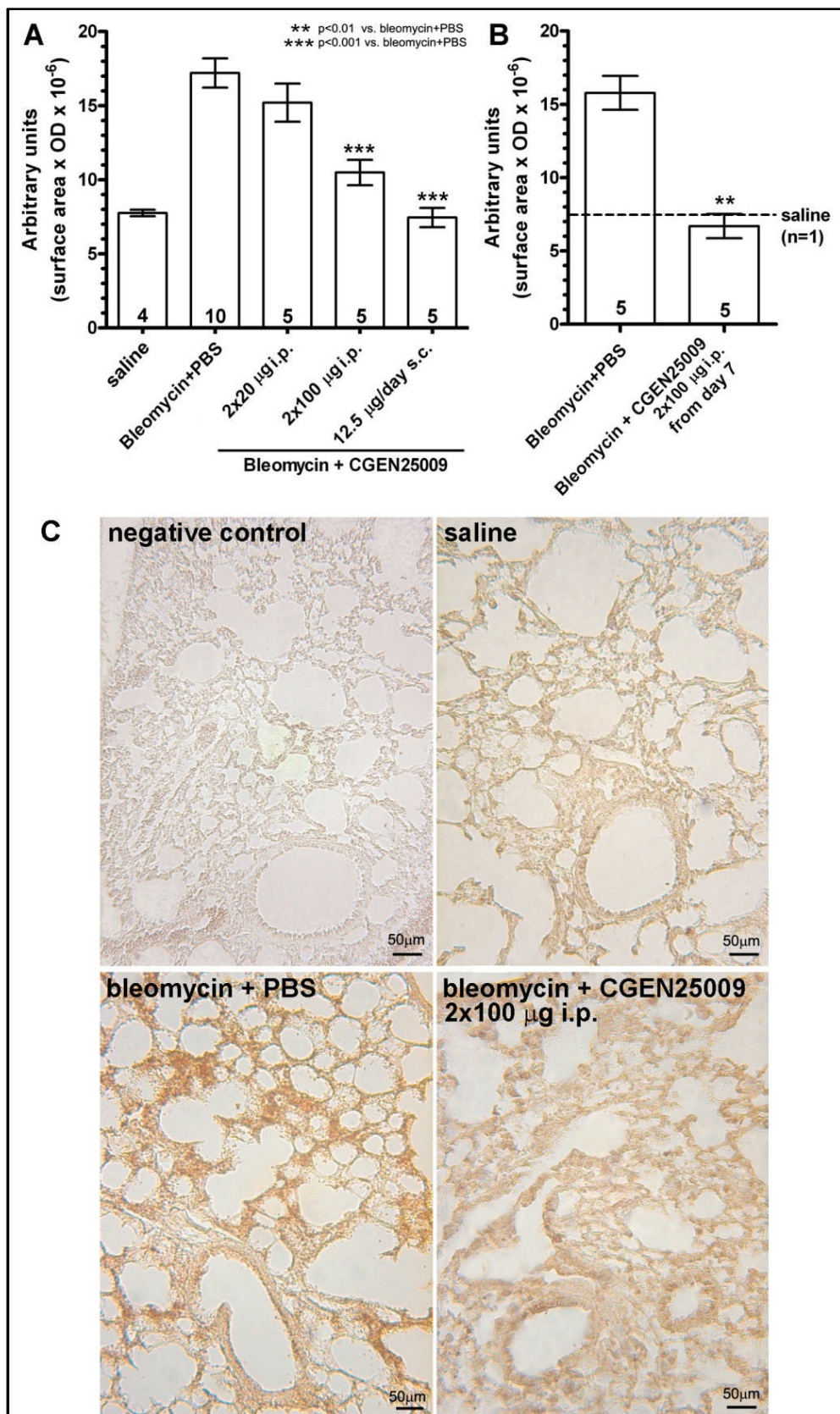


Fig.23 Studi *in vivo*. Livelli ed espressione di NT

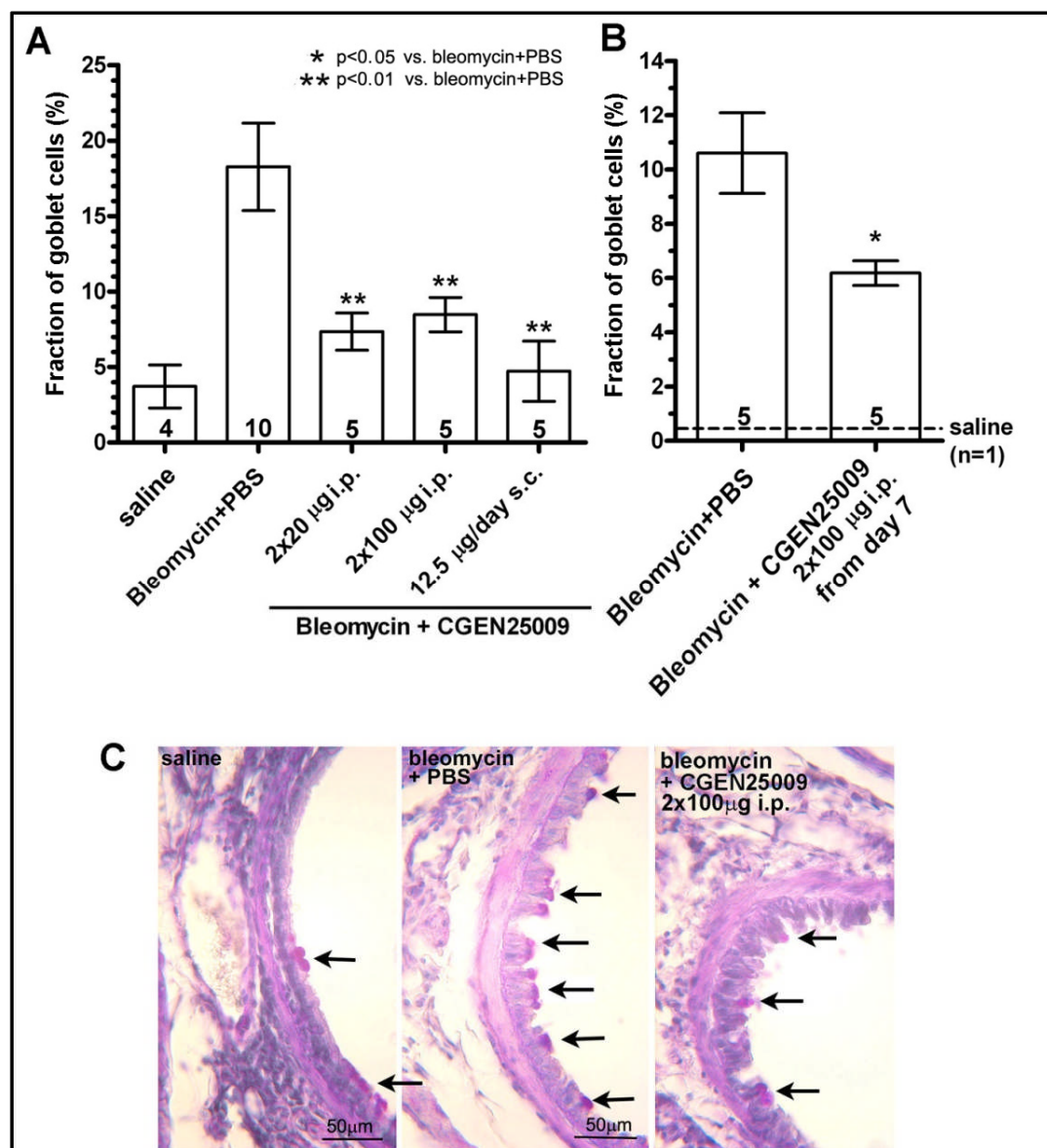


Fig.24 Studi *in vivo*. Iperplasia delle cellule mucipari caliciformi

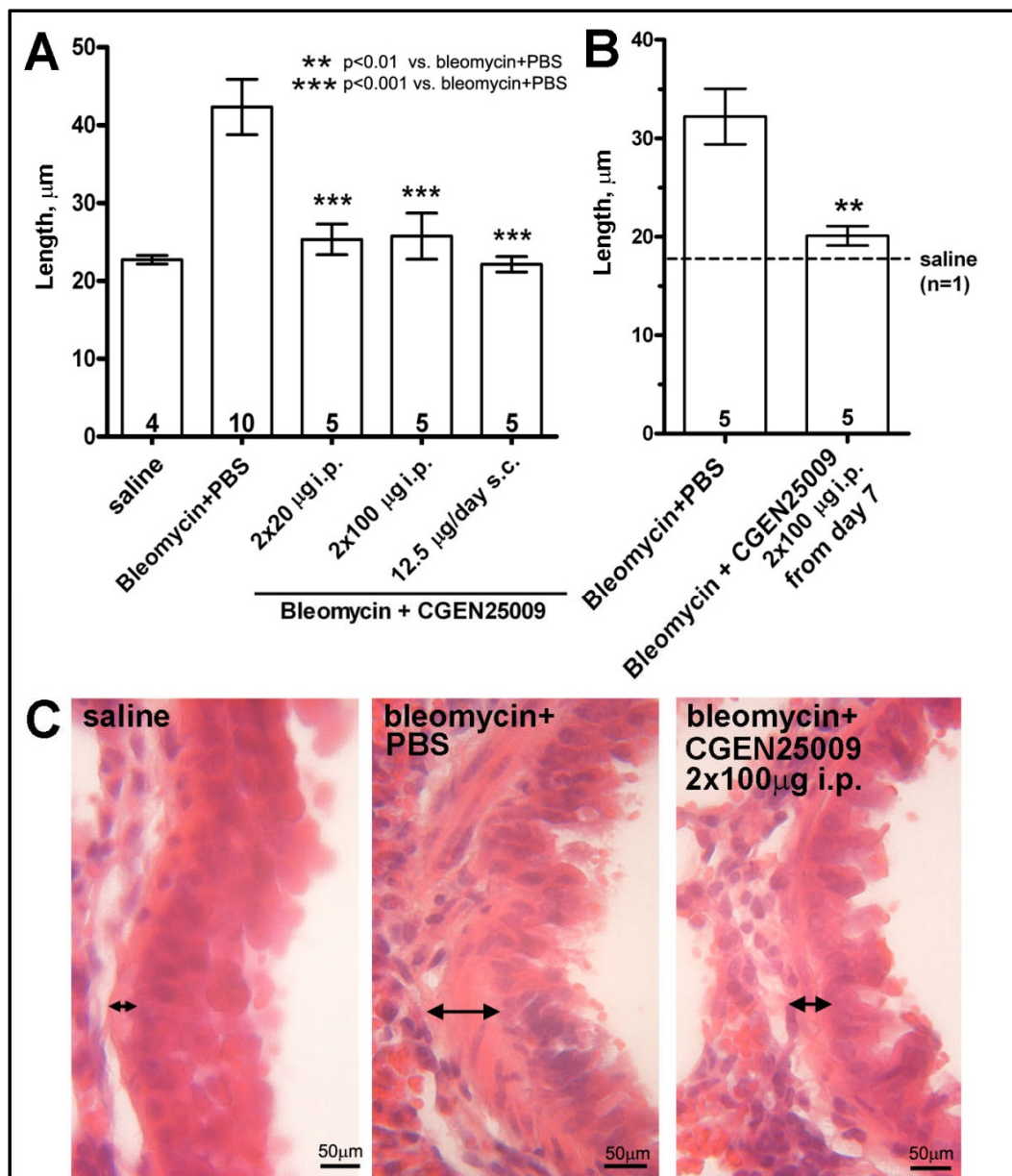


Fig.25 Studi *in vivo*. Spessore dello strato muscolare liscio

Discussione

I dati ottenuti in questo lavoro dimostrano le proprietà anti-infiammatorie ed anti-fibrotiche del nuovo agonista relassinico CGEN25009. Tali proprietà sono legate all'attivazione del recettore RXFP1 ad alta affinità per la relassina H2 (Shemesh et al., 2008; 2009).

I meccanismi molecolari indotti dalla relassina sulle cellule bersaglio implicano diverse vie di trasduzione del segnale a valle del recettore RXFP1 (per una rassegna, vedi van der Westhuizen et al., 2007), tra cui le meglio caratterizzate prevedono l'aumento dei livelli di cAMP intracellulare (Halls et al., 2009) e l'induzione dell'espressione di NO sintasi, con conseguente produzione di NO (Baccari e Bani, 2008).

Per caratterizzare l'attività biologica di CGEN25009 sono stati utilizzati due tipi cellulari THP1 e BJ3, che costitutivamente esprimono il recettore RXFP1. Date le differenze morfologiche e funzionali tra questi tipi cellulari, abbiamo scelto di valutare gli effetti di CGEN25009 sui meccanismi a valle del recettore RXFP1, quali l'aumento dei livelli di cAMP, cGMP e NO per le cellule THP-1 e la produzione di collagene e l'espressione MMP-2 per i fibroblasti: tali parametri peraltro sono stati utilizzati in precedenza proprio per caratterizzare le attività biologiche della relassina.

Questo studio dimostra che, come la relassina, anche CGEN25009 induce nelle cellule THP1 una risposta intracellulare specifica, consistente in un aumento dose-dipendente dei livelli di cAMP, cGMP ed NO, ad ulteriore riprova che tale agonista attiva il recettore RXFP1. Negli esperimenti *in vitro* però, CGEN25009 risulta 10 volte meno potente rispetto alla relassina nell'indurre la variazione dei livelli dei secondi messaggeri, il che si spiega o con una minore

affinità per il recettore oppure con un altro meccanismo di azione. Tuttavia, *in vivo*, le concentrazioni di CGEN25009 efficaci nel ridurre la fibrosi polmonare indotta da bleomicina sono equimolari rispetto a quelle usate per dimostrare l'efficacia della relassina nello stesso modello sperimentale.

Il trattamento di colture di fibroblasti con relassina determina importanti effetti anti-fibrotici, quali la inibizione dell'attività dei fibroblasti stessi, valutabile tramite la riduzione della produzione e dell'accumulo di collagene indotto da citochine pro-fibrotiche (TGF- β 1, angiotensina II) e l'aumento di espressione di MMP-2. Questo studio dimostra che anche il trattamento con CGEN25009 inibisce la deposizione di collagene indotta da TGF- β 1 ed aumenta l'espressione di MMP-2. E' molto probabile inoltre che, come la relassina, anche il peptide CGEN25009 attivi, per il tramite del recettore RXFP1, più meccanismi coinvolti nel turn-over del collagene (Samuel et al., 2007), tra cui anche l'induzione di MMP-2. Poiché il trattamento combinato di relassina e CGEN25009 non ha indotto alcun effetto sinergico sulla deposizione del collagene rispetto al trattamento con il solo CGEN25009, è logico pensare che, nel mediare gli effetti anti-fibrotici su fibroblasti BJ3, i due peptidi competano per lo stesso recettore e si avvalgano di analoghe vie di segnalazione intracellulare. Inoltre, la somministrazione di CGEN25009 alla concentrazione massima, in grado di inibire la deposizione di collagene indotta da TGF- β 1, non ha alcun effetto sui livelli di collagene basali, ad indicarne la potenziale applicabilità terapeutica. Negli esperimenti *in vivo*, il trattamento con CGEN25009 si è rivelato efficace nel ridurre in modo importante la fibrosi, sia quando somministrato in modo preventivo, contemporaneamente alla bleomicina, sia quando impiegato in modo terapeutico, 7 giorni dopo la bleomicina durante la fase di massima induzione della fibrosi. In

entrambe la modalità infatti, CGEN25009 determina una marcata riduzione dei parametri infiammatori, quali l'infiltrato leucocitario, il danno ossidativo e nitrosativo del tessuto polmonare e il rimodellamento bronchiale patologico. Sebbene per insufficienza del campione non sia stato possibile effettuare un'analisi molecolare del metabolismo del collagene (espressione di TIMP/MMP), è verosimile pensare che la riduzione della fibrosi, osservata a seguito dei diversi trattamenti con CGEN25009, derivi da una stimolazione del turnover del collagene, in linea con i dati ottenuti *in vitro* sulle colture di fibroblasti.

Le condizioni infiammatorie croniche nel polmone determinano cambiamenti strutturali permanenti ed un rimodellamento patologico delle pareti delle vie aeree, di cui la fibrosi è il maggior costituente. Le patologie fibro-proliferative, tra cui la fibrosi polmonare idiopatica, sono tra le principali cause di mortalità nell'uomo, ma, nonostante il loro elevato impatto sociale ed economico, non esistono attualmente trattamenti comprovati che agiscano sui meccanismi di sviluppo della fibrosi e non esistono neppure terapie efficaci per migliorare il decorso clinico della patologia (Wynn, 2007; Paz e Shoenfeld, 2009). Nonostante alcuni potenziali composti siano in corso di valutazione da parte della Food and Drug Administration, nessun trattamento è stato finora approvato. E' dunque di fondamentale interesse per la ricerca e la medicina trovare un farmaco anti-fibrotico selettivo, potente e sicuro.

I risultati di questo studio indicano CGEN25009 come un nuovo, potenziale agente terapeutico con attività anti-infiammatoria e anti-fibrotica, il cui meccanismo d'azione sembra essere mediato dal recettore per la relassina RXFP1. Infatti, sebbene la relassina stia emergendo come un promettente agente terapeutico (Samuel et al.,

2007), essa ha una struttura complessa, di difficile e costosa produzione. In questo contesto, CGEN25009 può essere più accessibile della relassina per un'applicazione farmaceutica, in quanto è un peptide breve, a catena singola e di facile sintesi chimica, con un ragionevole rapporto tra il suo costo ed i potenziali benefici apportati.

Bibliografia

- Asahara T.; Masuda H.; Takahashi T.; Kalka C.; Pastore C.; Silver M.; Kearne M.; Magner M.; Isner JM. (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-8
- Baccari MC. and Bani D. (2008) Relaxin and nitric oxide signalling. *Curr Protein Pept Sci* 9:638–645
- Bai TR and Knight DA (2005) Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci (Lond)* 108:463–477
- Bani D., Bigazzi M. (1984) Morphological changes induced in mouse mammary gland by porcine and human relaxin. *Acta Anat (Basel)* 119: 149-154
- Bani D.; Bani Sacchi T.; Bigazzi M.; Bianchi S. (1988) Effect of relaxin on the microvasculature of mouse mammary gland. *Histol. Histopathol* 3: 337-343
- Bani D.; Bigazzi M.; Masini E.; Bani G.; Sacchi T.B. (1995) Relaxin depresses platelet aggregation:in vitro studies on isolated human and rabbit platelets. *Lab Invest* 73: 709-716
- Bani D.; Masini E.; Bello MG.; Bigazzi M.; Bani Sacchi T. (1995) Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55:5272-5275
- Bani D.; Maurizi M.; Bigazzi M. (1995) Relaxin reduces the number of circulating platelets and depresses platelet release from megakaryocytes: studies in rats. *Platelets* 6: 330-335
- Bani D. (1997). Relaxin: a pleiotropic hormone. *Gen Pharmacol* 28(1):13-22
- Bani D.; Ballati L.; Masini E.; Bigazzi M.; Sacchi T.B. (1997) Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs. *Endocrinology* 138: 1909-1915

- Bani D.; Masini E.; Bello M.G.; Bigazzi M.; Bani Sacchi T. (1998) Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. *Am. J. Pathol* 152: 1367-1376
- Bani D.; Failli P.; Bello M.G.; Thiemermann C.; Bani-Sacchi T.; Bigazzi M. et al (1998) Relaxin activates the L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle cells in culture. *Hypertension* 31: 1240-1247
- Bani D.; Nistri S.; Quattrone S.; Bigazzi M.; Bani-Sacchi T. (2001) The vasorelaxant hormone relaxin induces changes in liver sinusoid microcirculation: a morphological study in the rat. *J. Endocrinol.* 171: 541-549
- Bani D.; Baronti R.; Vannacci A.; Bigazzi M.; Sacchi T.B.; Mannaioni P.F.; Masini E. (2002) Inhibitory effects of relaxin on human basophils activated by stimulation of the Fc epsilon receptor. The role of nitric oxide. *Int Immunopharmacol* 2: 1195-1204
- Bani D., Nistri S., Cinci L., Giannini L., Princivalle H., Elliott L., Bigazzi M., Masini E. (2007) A novel, simple bioactivity assay for relaxin based on inhibition of platelet aggregation. *Regul Pept.* May 21
- Bani D. (2008) Relaxin as a natural agent for vascular health. *Vasc Health Risk Manag* 4:515-524
- Bani Sacchi T., Bani D., Brandi ML., Falchetti A., Bigazzi M. (1994) Relaxin influences growth, differentiation and cell-cell adhesion of human breast-cancer cells in culture. *Int J Cancer* 57:129-134
- Bani-Sacchi T., Bigazzi M., Bani D., Mannaioni P. F. and Masini E. (1995) Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 116: 1589-1594
- Bartsch O.; Bartlick B.; Ivell R. (2001) Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol Hum Reprod* 7(9): 799-809
- Bassel-Duby R.; Olson EN. (2003) Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1133-1141

- Bathgate R.A., Samuel C.S., Burazin T.C., Layfield S., Claasz A.A., Reytomas I.G., et al (2002) Human relaxin gene 3 (H3) and equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol. Chem* 277:1148-1157
- Bathgate RA; Samuel CS; Burazin TC; Gundlach AL; Tregear GW (2003) Relaxin: new peptides, receptors and novel actions. *Trends Endocrinol Metab*14:207-13
- Bathgate R.A.D.; Hsueh A.J. and Sherwood O.D (2006) Physiology and molecular biology of the relaxin peptide family. Knobil and Neill's Physiology of reproduction. Neill J.D. Elsevier
- Bathgate R.A.; Lekgabe ED.; McGuane JT.; Su Y, Pham T.; Ferraro T.; Layfield S.; Hannan RD.; Thomas WG.; Samuel CS.; Du XJ (2008) Adenovirus-mediated delivery of relaxin reverses cardiac fibrosis *B Mol Cell Endocrinol.* 280:30-8
- Beltrami AP.; Barlucchi L.; Torella D.; Baker M.; Limana F.; Chimenti S.; Kasahara H.; Rota M.; Musso E.; Urbanek K.; Leri A.; Kajstura J.; Nadal-Ginard B.; Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 114:763-76
- Berry M.F.; Engler A.J., Woo Y.J.; Pirolli T.J.; Bish L.T.; Jayasankar V., Morine K.J.; Gardner T.J.; Discher D.E.; Sweeney H.L. (2006) Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2196-2203
- Bigazzi M.; Del M.; Petrucci F.; Casali R.; Novelli G.P. (1986) The local administration of relaxin induces changes in the microcirculation of the rat mesocaecum. *Acta Endocrinol (Copenh)* 112: 296-299
- Bigazzi M.; Bani D.; Bani G.; Bani-Sacchi T. (1995) Relaxin and the cardiocirculatory system. In : *McLennan A. H., Treggar G., Bryant-Greenwood G. D. (eds) Progress in Relaxin Research.* Singapore: World Scientific Publishing, pp. 499-507
- Bigazzi M.; Bani G.; Bani Sacchi T.; Petrucci F.; Bianchi S. (1998) Relaxin: a mammatropic hormone promoting growth and differentiation of the pigeon crop sac mucosa. *Acta Endocrinol.* 117: 181-188

- Bradley P.P.; Priebat D.A.; Chriestensen R.D.; Rothstein E. (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206-209
- Baruscotti M.; Barbuti.; Bucchi A. (2010) The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 48:55-64
- Bryant-Greenwood G.D., Ali S., Mandel M., and Greenwood F. (1987). Ovarian and decidual relaxins in human pregnancy. *Adv Exp Med Biol* 219: 709-13
- Bryant-Greenwood G.D., Schwabe C. (1994) Human relaxins: chemistry and biology. *Endocr. Rev.* 15: 5-26
- Büllesbach E.E.; Schwabe C. (2005) The trap like relaxin-binding site of LGR7. *J Biol Chem* 280: 14051-14056
- Caplice N.M. (2006) The future of cell therapy for acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3: S129–32
- Chaudhary NI, Schnapp A, and Park JE (2006) Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 173:769–776
- Conrad K.P., Novak J. (2004) Emerging role of relaxin in renal and cardiovascular function. *Am. J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R250-R261
- Conrad K.P.; Debrah D.O.; Novak J.; Danielson L.A.; Shroff S.G. (2004) Relaxin modifies system arterial resistance and compliance in conscious, nonpregnant rats. *Endocrinology* 145: 3289-3296
- Cutroneo KR, White SL, Phan SH, and Ehrlich HP (2007) Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *J Cell Physiol* 211:585–589
- Dimmeler S.; Zeiher A.M.; Schneider M.D. (2005) Unchain my heart: scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115: 572-583
- Downing S.J.; Sherwood O.D. (1986) The physiological role of relaxin in the pregnant rat: IV the influence of relaxin on

cervical collagen and glycosaminoglycans. *Endocrinology* 118: 471-479

Dschietzig T., Richter C., Bartsch C., Laule M., Armbruster F.P., Baumann G., Stangl K. (2001) The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J* 15: 2187-2195

Dschietzig T.; Bartsch C.; Greinwald M.; Baumann G.; Stangl K. (2005) The pregnancy hormone relaxin binds to and activates the human glucocorticoid receptor. *Ann NY Acad Sci* 1041: 256-271

Dschietzig T.; Teichman S.; Unemori E.; Wood S.; Boehmer J.; Richter C.; Baumann G.; Stangl K. (2009) Intravenous recombinant human relaxin in compensated heart failure: a safety, tolerability, and pharmacodynamic trial. *J Card Fail* 15:182-190

Du X.J., Samuel C.S., Gao X.M., Zhao L., Parry L.J., and Tregear G.W. (2003). Increased myocardial collagen and ventricular diastolic dysfunction in relaxin deficient mice: a gender-specific phenotype. *Cardiovascular research*. 57(2): 395-404

Du XJ. (2007) Re-modelling 'hostile' milieu of diseased myocardium via paracrine function of transplanted cells or relaxin. *J Cell Mol Med*. 11: 1101-4

Duffy HS., Fort AG., Spray DC. (2006) Cardiac connexins: genes to nexus. *Adv Cardiol* 42:1-17

Failli P.; Nistri S.; Quattrone S.; Mazzetti L.; Bigazzi M.; Sacchi T.B. et al (2002) Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. *FASEB J* 16: 252-254

Fevold H. L., Hisaw F. L and Meyer R. K. (1930) The relaxative hormone of the corpus luteum. Its purification and concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 52: 3340-3348

Figueiredo KA., Mui AL., Nelson CC. and Cox ME. (2006) Relaxin stimulates leukocyte adhesion and migration through a relaxin receptor LGR7-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281:3030-3039

- Fisher C., Berry C., Blue L., Morton JJ., McMurray J. (2003) N-terminal pro B type natriuretic peptide, but not the new putative cardiac hormone relaxin, predicts prognosis in patients with chronic heart failure. *Heart* 89:879–881
- Formigli L.; Francini F.; Tani A.; Squecco R.; Nosi D.; Polidori L.; Nistri S.; Chiappini L.; Cesati V.; Pacini A.; Perna A.M.; Orlandini G.E.; Zecchi Orlandini S.; Bani D. (2005) Morphofunctional integration between skeletal myoblasts and adult cardiomyocytes in coculture is favored by direct cell-cell contacts and relaxin treatment. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: 795-804
- Formigli L.; Perna AM.; Meacci E.; Cinci L.; Margheri M.; Nistri S.; Tani A.; Silvertown J.; Orlandini G.; Porciani C.; Zecchi-Orlandini S.; Medin J.; Bani D. (2007) Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodeling. *J Cell Mol Med*.11:1087–110
- Formigli L.; Francini F.; Nistri S.; Margheri M.; Luciani G.; Naro F.; Silvertown JD.; Zecchi Orlandini S.; Meacci E.; Bani D. (2009) Skeletal myoblasts overexpressing relaxin improve differentiation and communication of primary murine cardiomyocyte cell cultures. *J Mol Cell Cardiol* 47: 335-345
- Garber S.L.; Mirochinik Y.; Brecklin C.S.; Unemori E.N.; Singh A.K.; Slobodskoy L. et al (2001) Relaxin decreases renal interstitial fibrosis and slows progression of renal disease. *Kidney Int* 59: 314-320
- Garber S.L.; Mirochnik Y.; Brecklin C.; Slobodskoy L.; Arruda J.A.; Dunea G. (2003) Effect of relaxin in two models of renal mass reduction *Am J Nephrol.* 23:8-12
- Gharaee-Kermani M.; Hu B.; Phan SH.; and Gyetko MR (2009) Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFβ signaling and the myofibroblast. *Curr Med Chem* 16:1400–1417
- Gnecchi M.; He H.; Liang OD. (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 11: 367–8
- Guico-Lamm ML.; Sherwood OD.; (1988) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. II. Passive immunization with

monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy disrupts birth in intact rats. *Endocrinology* 123:2479-85

Gunnensen J.M., Crawford R.J., and Tregear G.W. (1995) Expression of the relaxin gene in rat tissues. *Mol Cell Endocrinol* 110(1-2): 55-64

Gunnensen J.M., Fu P., Roche P.J., and Tregear G.W. (1996). Expression of human relaxin gene: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species. *Mol Cell Endocrinol* 118(1-2):85-94

Hahn WC., Counter CM., Lundberg AS., Beijersbergen RL., Brooks MW. and Weinberg RA. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400:464-468

Haider HK.; Ye L.; Jiang SJ.; et al. (2004) Angiomyogenesis for cardiac repair using human myoblasts as carriers of human vascular endothelial growth factor. *J Mol Med.* 82: 539-49

Halls ML.; Bathgate RA. and Summers R. (2006) Relaxin family peptide receptors RXFP1 and RXFP2 modulate cAMP signaling by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol* 70:214-226

Han X., Habuchi Y. and Giles W. R. (1994) Relaxin increases heart rate by modulating calcium current in cardiac pacemaker cells. *Circ Res* 74: 537-541

Hardie WD., Glasser SW. and Hagood JS. (2009) Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol* 175:3-16

Harvey RP. (1996) NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol* 178:203-216

Heeg M.H.; Koziolk M.J.; Vasko R.; Schaefer L.; Sharma K.; Muller G.A. et al (2005) The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* 68: 96-109

Hisaw F. L. (1926) Experimental relaxation of the pubic ligament of guinea pig. *Proc. Exp. Biol. Med.* 23: 661-663

Holterman CE.; Rudnicki MA. (2005) Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* 16: 575-84

- Hosokawa T.; Okada T.; Kobayashi T.; Hashimoto K.; Seguchi H. (1994) Ultrastructural and immunocytochemical study of the leptomeres in the mouse cardiac muscle fibre. *Histol Histopathol* 9:85-94
- Hristov M.; Heussen N.; Schober A.; Weber C. (2006) Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *J Cell Mol Med* 10: 727-733
- Hsu S.Y.; Nakabayashi K.; Nishi S.; Kumagai J.; Kudo M.; Bathgate R.A.; et al (2002) Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* 295: 671-674
- Hsu S.Y. (2003) New insights into the evolution of the relaxin-LGR signalling system. *Trends Endocrinol Metab* 14:303-309
- H Hu X.; Yu SP.; Fraser JL.; et al. (2008) Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 135:799–808
- Jansen JA.; van Veen TA.; de Bakker JM.; van Rijen HV. (2010) Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol* 48:76-82
- Jegger D.; Jeanrenaud X.; Nasratullah M.; Chassot PG.; Mallik A.; Tevaearai H.; von Segesser LK.; Segers P.; Stergiopoulos N. (2006) Noninvasive Doppler-derived myocardial performance index in rats with myocardial infarction: validation and correlation by conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1540-1548
- Kakouris H., Eddie L. W. and Summers R. J. (1992) Cardiac effects of relaxin in rats. *Lancet* 339: 1076-1078
- Kamat AA.; Feng S.; Bogatcheva NV.; Truong A.; Bishop CE.; AgoulNIK AI. (2004) Genetic targeting of relaxin and insulin-like factor 3 receptors in mice. *Endocrinology* 145:4712-20
- Koh GY.; Klug MG.; Soonpaa MH.; Field LJ. (1993) Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest.* 92:1548-54

- Kompa A.R., Samuel C.S. and Summers R.J. (2002). Inotropic responses to human gene 2 (B29) relaxin in a rat model of myocardial infarction (MI): effect of pertussis toxin. *British Journal of Pharmacology*. 137(5): 710-8
- Kuenzi MJ.; Sherwood OD.; (1992) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. VII. Passive immunization with monoclonal antibodies throughout the second half of pregnancy prevents development of normal mammary nipple morphology and function in rats. *Endocrinology* 131:1841-7
- Jaber WA.; Holmes DR. (2006) Outcome and quality of care of patients who have acute myocardial infarction. *Med Clin North Am* 91:751-68
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-9
- Le Menuet D.; Munier M.; Meduri G.; Viengchareun S.; Lombès M. (2010) Mineralocorticoid receptor overexpression in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes increases their beating frequency. *Cardiovasc Res* 87:467-475
- Lekgabe E.D.; Kiriazis H.; Zhao C.; Xu Q.; Xiao L.M.; Su Y.; Bathgate R.A.D.; Xiao J.D.; Samuel C.S. (2005) Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 46: 412-418
- Leobon B.; Garcin I.; Menaschè P.; Vilquin J-T.; Audinat E., Charpak S. (2003) Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7808-7811
- Lin JH.; Lou N.; Kang N.; Takano T.; Hu F.; Han X.; Xu Q.; Lovatt D.; Torres A.; Willecke K.; Yang J.; Kang J.; Nedergaard M. (2008) A central role of connexin 43 in hypoxic preconditioning. *J Neurosci* 28:681-695
- Liu C., Eriste E., Sutton S., Chen J., Roland B., Kuei C., Farme N., Jornvall H., Sillard R., and Lovenberg T.W. (2003). Identification of relaxin-3/INSL7 as an endogenous ligand of

the orphan G-protein coupled receptor GPCR135. *J Biol Chem* 50:50754-64

Livak KJ. and Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-8

Lu G, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Sca-1+ stem cell survival and engraftment in the infarcted heart: dual role for preconditioning-induced connexin-43. *Circulation* 2009;119:2587-2596

Marriott D., Gillece-Castro B., Gorman C.M. (1992) Prohormone convertasi-1 will process prorelaxin, a member of the insuline family of hormones. *Mol Endocrinol* 6: 1441-1450

Masini E.; Bani D.; Bigazzi M.; Mannaioni P.F.; Bani-Sacchi T. (1994) Effects of relaxin on mast cells. In vitro and in vivo studies in rats and guinea pigs. *J Clin Invest* 94: 1974-1980

Masini E.; Bani D.; Bello M.G.; Bigazzi M.; Mannaioni P.F.; Bani-Sacchi T. (1997) Relaxin counteracts myocardial damage induced by ischemia-reperfusion in isolated guinea pig hearts: evidence for an involment of nitric oxide. *Endocrinology* 138: 4713-4720

Masini E.; Nistri S.; Vannacci A.; Bani Sacchi T.; Novelli A.; Bani D. (2004) Relaxin inhibits the activation of human neutrophils: involvement of the nitric oxide pathway. *Endocrinology* 145: 1106-1112

Masini E.; Nistri S.; Vannacci A.; Bani Sacchi T.; Novelli A.; Bani D. (2004) Relaxin inhibits the activation of human neutrophils: involvement of the nitric oxide pathway. *Endocrinology* 145: 1106-1112

Masini E.; Cuzzocrea S.; Mazzon E.; Muia` C.; Vannacci A.; Fabrizi F. and Bani D (2006) Protective effects of relaxin in ischemia/reperfusion-induced intestinal injury due to splanchnic artery occlusion. *Br J Pharmacol* 148:1124-1132

Mazoujian G., and Bryant-Greenwood G.D., (1990). Relaxin in breast tissue. *Lancet* 335: 298-9

McDonald GA.; Sarkar P.; Rennke H.; Unemori E.; Kalluri R.; Sukhatme VP. (2003) Relaxin increases ubiquitin-dependent

degradation of fibronectin in vitro and ameliorates renal fibrosis in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F59-67

McGowan B.M.; Stanley S.A.; Smith K.L.; Minnion J.S.; Donovan J.; Thompson E.L.; Patterson M.; Connolly M.M.; Abbott C.R.; Small C.J. Gardiner J.V.; Ghatei M.A.; Bloom S.R. (2006) Effects of acute and chronic relaxin-3 on food intake and energy expenditure in rats. *Regul Pept* 136: 72-77

Moeller A.; Ask K.; Warburton D.; Gauldie J. and Kolb M. (2008) The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* 40:362–382

Molkentin JD. (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275:38949-38952

Moore XL.; Tan SL.; Lo CY. (2007) Relaxin antagonizes hypertrophy and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology*. 148: 1582–9

Morgan EE.; Faulx MD.; McElfresh TA. (2004) Validation of echocardiographic methods for assessing left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: h2049–53

Mullane K.M.; Kraemer R.; Smith B. (1985) Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 14: 157-167

Muller P.; Beltrami AP.; Cesselli D.; Pfeiffer P.; Kazakov A.; Bohm M. (2005) Myocardial re generation by endogenous adult progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 39:377-87

Nicozisis J.L.; Nah-Cederquist H.D.; Tuncay O. C. (2000) Relaxin affects the dento facial tissue. *Clin. Orthod. Res* 3: 192-201

Nistri S.; Chiappini L.; Sassoli C.; Bani D. (2003) Relaxin inhibits lipopolysaccharide-induced adhesion of neutrophils to coronary endothelial cells by a nitric oxide-mediated mechanism. *FASEB J* 17: 2109-2111

Nistri S.; Bani D. (2005) Relaxin in vascular physiology and pathophysiology: possible implications in ischemic brain disease. *Curr Neurovasc Res* 2:225-234

- Novak J.; Danielson L.A.; Kercher L.J.; Sherwood O.D.; Ramirez R.J.; Moalli P.A.; Conrad K.P. (2001) Relaxin is essential for renal vasodilation during pregnancy in conscious rats. *J Clin Invest* 107: 1469-1475
- Nguyen B.T.; Yang L.; Sanborn BM. and Dessauer CW. (2003) Phosphoinositide 3-kinase activity is required for biphasic stimulation of cyclic adenosine 3',5'- monophosphate by relaxin. *Mol Endocrinol* 17:1075–1084
- Nguyen B.T.; Dessauer C.W. (2005) Relaxin stimulates protein kinase C ζ translocation: requirement for cyclic adenosine 3',5'- monophosphate production. *Mol Endocrinol* 19: 1012-1023
- Nygren JM.; Jovinge S.; Breitbach M.; Säwén P.; Röhl W.; Hescheler J.; Taneera J.; Fleischmann BK.; Jacobsen SE (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation *Nat Med.* 10:494-501
- Osheroff P.L.; Cronin M.J.; Lofgren J.A. (1992) Relaxin binding in the rat heart atrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2384-2388
- Osheroff P.L. and Ho W.H. (1993) Expression of relaxin mRNA and relaxin receptors in postnatal and adult rat brains and hearts. Localization and developmental patterns. *J Biol Chem* 268: 15193-15199
- Palejwala S.; Stein D.; Weiss G.; Monia B.P.; Tortoriello D.; Goldsmith L.T. (2001) Relaxin positively regulates matrix metalloproteinase expression in human lower uterine segment fibroblasts using a tyrosine kinase signalling pathway. *Endocrinology* 142: 3405-3413
- Parsell DA.; Mak JY.; Amento EP. and Unemori EN. (1996) Relaxin binds to and elicits a response from cells of the human monocytic cell line, THP-1. *J Biol Chem* 271:27936–27941
- Paz Z and Shoenfeld Y (2010) Antifibrosis: to reverse the irreversible. *Clin Rev Allergy Immunol* 38:276–286
- Peaker M., Taylor E., Tashima L., Redman T.L., Greenwood F.C., and Bryant-Greenwood G.D. (1989). Relaxin detected by immunocytochemistry and northern analysis in the mammary gland of the guinea pig. *Endocrinology* **125**(2): 693-8

- Perna A.M. ; Masini E. ; Nistri S. ; Bani Sacchi T. ; Bigazzi M. ; Bani D. (2005) Human recombinant relaxin reduces heart injury and improves ventricular performance in a swine model of acute myocardial infarction. *Ann NY Acad Sci* 1041 : 431-433
- Perna A.M. ; Masini E. ; Nistri S. ; Briganti V. ; Chiappini L. ; Stefano P. ; Bigazzi M. ; Pieroni C. ; Bani Sacchi T. ; Bani D. (2005) Novel drug development opportunity for relaxin in acute myocardial infarction : evidence from a swine model. *FASEB J* 19 : 1525-1527
- Piedras-Renteria E.S.; Sherwood O.D; Best P.M. (1997b) Effects of relaxin on rat atrial myocytes. II. Increased calcium influx derived from action potential prolongation. *Am J Physiol* 272: H1798-H1803
- Qin X.; Garibay-Tupas J.; Chua P.K.; Cachola L.; Bryant-Greenwood G.D. (1997) An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol Reprod* 56: 800-811
- Rosenkraz S., Flesch M., Amann K., Haeuseler C., Kilter H., Seeland U., Schulter K.D. and Bohm M. (2002). Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(3) : H1253-62
- Rubart M. and Field LJ. (2006) Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* 68 :29-49
- Rubart M. Field LJ. (2008) Stem cell differentiation: cardiac repair. *Cell Tiss Organs* 188: 202–11
- Samuel C.S., Butkus A., Coghlan JP. and Bateman JF. (1996) The effect of relaxin on collagen metabolism in the nonpregnant rat pubic symphysis: the influence of estrogen and progesterone in regulating relaxin activity. *Endocrinology* 137:3884– 3890
- Samuel C.S., Tian H., Zhao L., and Ameto E.P. (2003). Relaxin is a key mediator of prostate growth and male reproductive tract development. *Lab Invest* 83(7) : 1055-67
- Samuel C.S., Parry L.J., and Summers R.J. (2003). Physiological or pathological role for relaxin in the cardiovascular system ? *Curr Opin Pharmacol* 3(2): 152-8

- Samuel C.S., Zhao C., Bond C.P., Hewitson T.D., Amento E.P., and Summers R.J. (2004). Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney Int* 65(6) : 2054-64
- Samuel C.S.; Unemori E.N.; Mookerjee I.; Bathgate R.A.; Layfield S.L.; Mak J. et al (2004) Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology* 145: 4125-4133
- Samuel CS.; Zhao C.; Bathgate RA.; DU XJ.; Summers RJ.; Amento EP.; Walker LL.; McBurnie M.; Zhao L.; Tregear GW.; (2005) The relaxin gene-knockout mouse: a model of progressive fibrosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1041:173-81
- Samuel C. S.; Xiao-Jun D.; Bathgate R.A.; Summers R.J. (2006) Relaxin the stiffened heart and arteries: the therapeutic potential for relaxin in the treatment of cardiovascular disease *Pharmacol & Therap* 112: 529-552
- Samuel CS.; Samuel CS.; Hewitson TD.; Unemori EN.; and Tang ML (2007) Drugs of the future: the hormone relaxin. *Cell Mol Life Sci* 64:1539–1557
- Samuel CS.; Lekgabe ED. and Mookerjee I. (2007) The effects of relaxin on extracellular matrix remodeling in health and fibrotic disease. *Adv Exp Med Biol* 612:88–103
- Samuel C. S.; Hewitson TD.; Zhang Y.; Kelly DJ. (2008) Relaxin ameliorates fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Summers R.J.Endocrinology.* 2008 149:3286-93
- Scobioala S.; Klocke R.; Kuhlmann M.; Tian W.; Hasib L.; Milting H. (2008) Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocyte. *FASEB J* 22:1021-31
- Scott D.J.; Layfield S.; Yan Y.; Sudo S.; Hsueh A.J.; Tregear G.W.; Bathgate R.A. (2006) Characterization of novel splice variants of LGR7 and Lgr8 reveals that receptor signalling is mediated by their unique low density lipoprotein class A modules. *J Biol Chem* 281: 34942-34954
- Seibold J.R.; Korn J.H.; Simms R.; Clements P.J.; Moreland L.W.; Mayes M.D. et al. (2000) Recombinant human relaxin in the

treatment of scleroderma. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 132: 871-879

Shemesh R.; Toporik A.; Levine Z.; Hecht I.; Rotman G.; Wool A.; Dahary D.; Gofer E.; Kliger Y.; Soffer MA.; et al. (2008) Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 283:34643–34649

Shemesh R.; Hermesh C.; Toporik A.; Levine Z.; Novik A.; Wool A.; Kliger Y.; Rosenberg A.; Bathgate RA. and Cohen Y. (2009) Activation of relaxin-related receptors by short, linear peptides derived from a collagen-containing precursor. *Ann NY Acad Sci* 1160:78–86

Sherwood, O. D. (2004). Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr Rev* 25(2):205-34

Silvertown J.D.; Ng J.; Sato T.; Summerlee A.J.; Medin J.A. (2006) H2 relaxin overexpression increases in vivo prostate xenograft tumor growth and angiogenesis. *Int J Cancer* 118: 62-73

Skott O. And Carter A.M. (2002) Relaxin is a vasodilator hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2): R347-8

Smeeckens S.P., Montag A.G., Thomas G., Albiges-Rizo C., Carroll R., Benig M., Phillips L.A., Martin S., OhagiS., Gardner P. et al (1992) Proinsulin processing by the subtilisin-related proprotein convertase furin PC2, and PC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8822-8826

Smits P.C., van Geuns R.J.; Poldermans D.; Bountiukos M.; Onderwater E.E.; Lee C.H.; Maat A.P.; Serruys P.W. (2003) Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 42: 2063-2069

Smolle J., Fiebiger M., Hofmann-Wellenhof R. and Kerl H. (1996) Quantitative morphology of collagen fibers in cutaneous malignant melanoma and melanocytic nevus. *Am J Dermatopathol* 18:358–363

St.Louis J.; Massicote G. (1985) Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rat. *Life Sci* 37: 1351-1357

- Stults J.T., Bourell J.H., Canova-Davis E. et al (1990) Structural characterization by mass spectrometry of native and recombinant human relaxin. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 19: 655-664
- Sudo S.; Kumagai J.; Nishi S.; Layfield S.; Ferraro T.; Bathgate R.A.; et al (2003) H3 relaxin is a specific ligand for LGR7 and activates the receptor by interacting with both the ectodomain and the exoloop2. *J Biol Chem* 278: 7855-7862
- Sunn N.; Egli M.; Burazin T.C.; Burns P.; Colvill L.; Davern P. et al (2002) Circulating relaxin acts on subfornical organ neurons to stimulate water drinking in the rat. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 1701-1706
- Suzuki K.; Murtuza B.; Fukushima S.; Smolenski R.T.; Varela-Carver A.; Coppen S.R.; Yacoub M.H..(2004) Targeted cell delivery into infarcted rat hearts by retrograde intracoronary infusion: distribution, dynamics, and influence on cardiac function. *Circulation* 110: 225-230
- Suzuki YJ.; Nagase H.; Day RM.; Das DK. (2004) GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol* 37:1195-203
- Tan Y.Y.; Wade J.D.; Tregear G.W; Summers R. J. (1998) Comparison of relaxin receptors in rat isolated atria and uterus by use of synthetic and native relaxin analogues. *Br J Pharmacol* 123: 762-770
- Taylor DA.; Atkins BZ.; Hungspreugs P.; Jones TR.; Reedy MC.; Hutcheson KA.; Glower DD.; Kraus WE. (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 4:929-33
- Teichman SL.; Unemori EN.; Dshcietzig T.; Confrad K.; Voors AA.; Teerlink JR.; Felker GM.; Metra M.; Cotter G. (2009) Relaxin, a pleiomorphic vasodilator for the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev* 14:321-329
- Thomas GR.; Vandlen R. (1993) The purely chronotropic effects of relaxin: atrial cardiocytes. *J Endocrinol* 143: R5-R8
- Toko H.; Zhu W.; Takimoto E.; Shiojima I.; Hiroi Y.; Zou Y.; Oka T.; Akazawa H.; Mizukami M.; Sakamoto M.; Terasaki F.; Kitaura

- Y.; Takano H.; Nagai T.; Nagai R.; Komuro I. (2002) Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *J Biol Chem* 277:24735-24743
- Too CK; Bryant-Greenwood GD; Greenwood FC (1984) Relaxin increases the release of plasminogen activator, collagenase, and proteoglycanase from rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 115:1043-50
- Toth M.; Taskinen P.; Ruskoaho H. (1996) Relaxin stimulates atrial natriuretic peptide secretion in perfused rat heart. *J Endocrinol* 150: 487-495
- Tse HF.; Kwong YL.; Chan JK.; Lo G.; Ho CL.; Lau CP (2003) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 36:47-9
- Unemori E.N.; Amento E. P. (1990) Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem* 265: 10681-10685
- Unemori E.N.; Beck L. S.; Lee W. P.; Xu Y.; Siegel M.; Keller G., *et al.* (1993) Human relaxin decrease collagen accumulation *in vivo* in two rodent model of fibrosis. *J. Invest. Dermatol.* 101: 280-285
- Unemori E. N.; Pickford L.B.; Salles A.L.; Piercy C.E.; Grove B.H.; Erikson M.E.; *et al* (1996) Relaxin induces an extracellular matrix degrading phenotype in human lung fibroblast in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J Clin Invest* 98: 2739-2745
- Unemori E.N.; Erikson M.E.; Rocco S.E.; Sutherland K.M.; Parsell D.A.; Mak J.; *et al.* (1999) Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor in normal human endometrial cells in vitro and is associated with menometrorrhagia in women. *Hum. Reprod* 14: 800-806
- Unemori E.N.; Lewis M.; Constant J.; Arnold G.; Grove B.H.; Normand J.; *et al.* (2000) Relaxin induces vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis selectively in wound sites. *Wound Repair Regen* 8: 361-370

- Unlu Y.; Karapolat S. (2008) Effects of implantation of bone marrow cells on cytokine levels in the ischemic heart tissue. An experimental study. *J Cardiothorac Surg* 3:30
- van der Westhuizen ET.; Halls ML.; Samuel CS.; Bathgate RA, Unemori EN.; Sutton SW. and Summers RJ. (2008) Relaxin family peptide receptors—from orphans to therapeutic targets. *Drug Discov Today* 13:640–651
- Walsh J.R., Niall H.D. (1980) Use of octadecylsilica purification method proteolysis during isolation of porcine and rat relaxins. *Endocrinology* 107: 1258-1260
- Wang-Lee J.L.; Lenhart J.A.; Ohlet K.M.; Ryan P.L; Bagnell C.A. (1998) Regulation of urokinase- and tissue-type plasminogen activator by relaxin in the uterus and cervix of the prepuberal gilt. *JReprod Fertil* 114: 119-125
- Ward D.G.; Thomas G.R.; Cronin M.J. (1992) Relaxin increases rat heart rate by a direct action on the cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 999-1005
- Williams E.J.; Benyon R.C.; Trim N.; Hadwin R.; Grove B.H.; Arthur M.J. et al (2001) Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 49: 577-583
- Wollert K.C. and Drexler H. (2010) Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nat Rev Cardiol* 7: 204-215
- Wörsdörfer P.; Maxeiner S.; Markopoulos C.; Kirfel G.; Wulf V.; Auth T.; Urschel S.; von Maltzahn J.; Willecke K. (2008) Connexin expression and functional analysis of gap junctional communication in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:431-439
- Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117:524–529
- Ye L.; Haider HK.; Sim EKW. (2006) Adult stem cells for cardiac repair: a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp Biol Med.* 231: 8–19

- Yki-Jarvien H., Wahlstrom T. and Seppala M. (1983). Immunohistochemical demonstration of relaxin in the genital tract of men. *J Reprod Fertil* 69(2): 693-5
- Zarre-Hoshyari-Khah R., Bartsch O., Einspainer A., Pohnke Y., Ivell R. (2001) Bioactivity of recombinant prorelaxin from the marmoset monkey. *Regul. Pept.* 97: 139-146
- Zhang J. ; Yong-Fen Q. ; Bing G. ; Chun-Shui P. ; Jin Z. ; Li C. ; Jun Y. ; Jaw-Kang C. ; Chao-Shu T. (2005) Effect of relaxin on myocardial ischemia injury induced by isoproterenol. *Peptides* 26 : 1632-1639
- Zhao S.; Sherwood OD. (1998) Monoclonal antibodies specific for rat relaxin. X. Endogenous relaxin induces changes in the histological characteristics of the rat vagina during the second half of pregnancy. *Endocrinology* 139:4726-34