

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN CARDIOCHIRURGIA

CICLO XX: TISSUE ENGINEERING NELLE VALVOLE CARDIACHE

BIOLOGICHE

“L’IMPIEGO DELLE CELLULE STAMINALI ADULTE DERIVATE
DAL MIDOLLO OSSEO NELLA TERAPIA RIGENERATIVA
CARDIACA.”

Coordinatore: Prof. Tiziano Gherli

Dottorando: Dott. Francesco Nicolini

INDICE	Pag.
Introduzione	3
Basi di biologia delle cellule staminali	4
Il trapianto cardiaco di cellule staminali	7
I mioblasti scheletrici nella terapia rigenerativa cardiaca	8
Plasticità delle cellule staminali cardiache adulte	14
Le cellule staminali midollari e la rigenerazione cardiaca	15
I meccanismi potenziali della riparazione/rigenerazione miocardica mediata dalle cellule staminali	21
Impiego potenziale delle cellule staminali derivate dal midollo osseo nella ingegneria tissutale	23
Protocollo di ricerca	
a) Introduzione	36
b) Materiali e Metodi	37
c) Risultati	40
d) Discussione e conclusioni	45
Bibliografia	46

INTRODUZIONE

Le malattie cardiovascolari come l'infarto miocardico, le malattie congenite complesse, e la conseguente insufficienza cardiaca sono tra le principali cause di mortalità. Attualmente, i grafts impiegati per la terapia sostitutiva o riparativa sono imperfetti e sottopongono i pazienti a uno o più rischi includenti la trombosi, la durata limitata, l'aumentata suscettibilità alle infezioni e la necessità di reintervento nei bambini e nei giovani a causa della mancata contemporanea crescita di tali condotti (1).

L'ingegneria tissutale sta emergendo come nuovo approccio potenzialmente curativo per la sostituzione del miocardio danneggiato o per la ricostruzione di malformazioni congenite. In generale, le cellule sono posizionate su matrici tridimensionali di polimeri biodegradabili per formare prodotti tissutali viventi tridimensionali aventi proprietà strutturali o funzionali tali da poter essere usati nel ripristino, mantenimento o miglioramento della funzione tissutale (2).

Un quadro in continua espansione è poi quello dei pazienti con insufficienza cardiaca congestizia che nella maggior parte dei casi hanno una storia di malattia coronarica aterosclerotica. Questa patologia causa il restringimento del lume vasale, stimola la trombogenesi, riduce il flusso coronarico e conduce ad un danno ischemico cardiaco. Il rimodellamento inverso del miocardio che consegue ad un danno ischemico può causare disfunzione ventricolare contrattile con i sintomi dell'insufficienza cardiaca (3). Inoltre nel cuore con insufficienza contrattile, le cellule cardiache possono andare incontro ad alterazioni degenerative, apoptosi o ipertrofia (4). Con la perdita di miociti contrattili, il miocardio incrementa la produzione di tessuto connettivo fibrotico, fino alla formazione di cicatrici tissutali ipocellularizzate ed alla ridotta capacità contrattile ventricolare (5).

Il trapianto cardiaco rimane l'opzione terapeutica di scelta nei pazienti con insufficienza cardiaca terminale anche se limitata dalla insufficiente disponibilità di donatori e dai problemi legati al rigetto immunitario, alle infezioni ed alle complicanze trombotiche. Tra i trattamenti alternativi la terapia rigenerativa miocardica con l'impianto di cellule staminali è una nuova terapia potenzialmente utilizzabile per ripopolare il miocardio di miociti funzionali e per promuovere la neovascolarizzazione in aree di miocardio danneggiato (6).

Le cellule staminali sono clonogeniche ed hanno capacità di auto-rigenerazione e, in certe condizioni, riescono a differenziarsi in linee cellulari multiple. Le cellule embrionali sono cellule totipotenti e derivano dalla massa cellulare interna della blastocisti. Tuttavia, problemi etici, problemi legali legati alla potenziale tumorigenicità e la necessità di usare ceppi allogenici per il trapianto cellulare ne limitano la potenzialità in ambito clinico. Recenti studi hanno mostrato che le cellule staminali adulte hanno capacità di automoltiplicazione in vitro nonché quella di differenziarsi in tipi cellulari specializzati. Tali cellule possono essere isolate da un'ampia varietà di tessuti quali il midollo osseo, il sangue periferico, il muscolo ed il tessuto adiposo.

In analogia ai grafts tissutali cardiaci correntemente usati in cardiocirurgia pediatrica, i preparati di ingegneria tissutale miocardici costruiti con cellule staminali dovrebbero consentire la riparazione del muscolo cardiaco danneggiato qualora confermassero definitivamente di possedere adeguate proprietà contrattili, di divenire vascolarizzati ed integrati nel miocardio ospite e di permettere un accoppiamento elettrico con i miocardiociti nativi (7).

BASI DI BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali sono una popolazione di cellule precursori tissutali immature capaci di auto-rinnovamento o proliferazione ma anche capaci di differenziazione in uno spettro di vari tipi cellulari in appropriate condizioni. In generale, esse posseggono le seguenti caratteristiche: 1) alta capacità di auto-rigenerazione; 2) la potenzialità per una differenziazione multipotente; 3) l'abilità di essere poste in coltura ex vivo ed essere usate per l'ingegneria tissutale (riprogrammazione); 4) plasticità (ossia la capacità di transdifferenziazione) (8).

Sulla base del potenziale differenziativo, le cellule staminali possono essere attualmente classificate in quattro categorie: 1) totipotenti, 2) pluripotenti, 3) multipotenti e 4) monopotenti o oligopotenti. Le cellule staminali totipotenti hanno la potenzialità di differenziarsi in cellule di tutti e tre i foglietti embrionali (ectodermico, mesodermico ed endodermico). Una cellula totipotente può differenziarsi in un organismo intero con un sistema nervoso centrale e periferico se impiantata in un utero funzionale. Nei mammiferi, soltanto zigoti e blastomeri ad uno stadio precoce di divisione sono cellule staminali totipotenti. Con la progressione della differenziazione gli zigoti formano gli strati cellulari interno ed esterno dell'embrione. Dalle cellule dello strato interno può originare qualsiasi tipo cellulare dell'organismo, ma solo in presenza dello strato esterno che diventerà la placenta. Le cellule dello strato interno sono dette pluripotenti e, come tali, continuano a dividersi, a specializzarsi ulteriormente e a diventare i progenitori di tessuti specifici. A questo stadio, esse sono cellule multipotenti cioè possono differenziarsi in diversi tipi cellulari all'interno di un dato organo. Per esempio le cellule staminali ematiche multipotenti o cellule staminali ematopoietiche possono differenziarsi in globuli rossi, globuli bianchi o piastrine. Le cellule staminali monopotenti od oligopotenti, infine, possono solo dare origine ad uno o a pochi tipi di

cellule specializzate. Per esempio le cellule mesenchimali possono differenziarsi in midollo osseo, tessuto adiposo, muscolo ed altro connettivo (9).

Sulla base della loro origine e delle proprietà biologiche, le cellule staminali possono essere classificate anche in 1) cellule staminali embrionali e 2) cellule staminali adulte.

Le cellule staminali embrionali derivano dal foglietto cellulare interno della blastocisti.

Avendo una potente capacità differenziativa, una singola cellula staminale embrionale può svilupparsi in più di 200 tipi cellulari e, quindi, in diversi tessuti od organi. Tali cellule posseggono la capacità di proliferare in uno stato indifferenziato per periodi prolungati in coltura e la capacità di differenziarsi in qualunque tipo tissutale in condizioni favorevoli (10). Le cellule staminali embrionali possono essere raccolte da tre fonti: feti abortiti, embrioni scartati dopo fecondazione in vitro ed embrioni creati in laboratorio esclusivamente con lo scopo di produrre cellule staminali. In vitro la differenziazione di cellule staminali embrionali umane in cardiomiociti è stata dimostrata da Kehat e coll (11). I problemi etici connessi con la raccolta di cellule staminali embrionali derivano soprattutto dalla necessaria distruzione dell'embrione di origine che è una potenziale vita e quindi coinvolge il credo religioso del singolo ricercatore o comunque lascia irrisolte fondamentali questioni morali e legislative. Altri potenziali ostacoli all'uso di tali cellule riguardano la necessità che i riceventi siano sottoposti a terapia immunosoppressiva in quanto le cellule embrionali sono potenzialmente allogeniche. La differenziazione incontrollata di tali cellule può infine causare problemi legati allo sviluppo di neoplasie vascolari o cardiache. Cellule embrionali trapiantate possono formare teratomi se sono ancora presenti cellule totipotenti: infatti è dimostrato che questi tumori contengono una miscela di tipi cellulari umani differenziati, incluse cellule caratteristiche dei tre foglietti embrionali (12).

Le cellule staminali adulte sono le cellule non differenziate che esistono in un tessuto od organo differenziato e che sono capaci di specializzarsi in cellule del tessuto od organo dal quale esse originano. La loro capacità di auto-rigenerazione permettono ai tessuti ed organi di mantenere stabilità e funzione. Fonti di cellule staminali adulte includono non soltanto i tessuti di rigenerazione come il midollo osseo, il sangue e l'epidermide, ma anche tessuti come il cervello o il fegato. Se comparate con le cellule embrionali, le cellule staminali adulte non comportano le problematiche etiche già citate o le controversie immunologiche, in quanto vengono usate nello stesso individuo dal quale esse sono state prelevate. Tuttavia la loro capacità di proliferazione e di differenziazione è meno potente di quella delle cellule embrionali: esse sono spesso difficili da identificare, isolare e purificare e spesso non sono abbastanza numerose nell'uso clinico per trapianto cellulare senza una espansione in vitro. Infine occorre ricordare che le cellule staminali adulte non si replicano indefinitamente in coltura (13).

IL TRAPIANTO CARDIACO DI CELLULE STAMINALI

Il trapianto di cellule staminali è stato usato recentemente per riparare il miocardio danneggiato, rigenerare nuovi miociti e migliorare la vascolarizzazione. Oltre alla generazione di nuovo miocardio, le cellule staminali impiantate possono partecipare al rimodellamento ed alla rivascolarizzazione del cuore dopo un insulto ischemico acuto o cronico. Questa terapia rappresenta una nuova frontiera nel trattamento delle malattie cardiovascolari. La selezione di un adeguato tipo di cellule staminali è la chiave per il successo della terapia rigenerativa cardiaca. In genere, per ottenere la riparazione o la rigenerazione tissutale più efficace, le cellule usate per il trapianto dovrebbero avere le seguenti caratteristiche:

- 1) Elevata capacità di sopravvivenza e proliferazione (dovrebbero essere capaci di raggiungere l'area danneggiata, mantenersi vitali e proliferare in quel tessuto);
- 2) Marcata capacità differenziativa (le cellule dovrebbero differenziarsi in uno specifico ceppo cellulare maturo per riparare il cuore);
- 3) Potenzialità per un innesto altamente efficace che consenta l'integrazione con le cellule ospiti (per esempio le cellule dovrebbero essere capaci di contrarsi dopo la differenziazione e di formare gap junctions intercellulari stabili con accoppiamento elettrofisiologico con le cellule native circostanti).

I neo-miociti formati dalle cellule staminali impiantate dovrebbero dunque essere dotati di miotubuli con proprietà elettromeccaniche identiche a quelle dei miotubuli dei cardiomiociti nativi. La loro contrazione dovrebbe rimanere sincrona durante la sistole e la diastole e quindi, in pratica, il trapianto cellulare cardiaco dovrebbe ottenere il risultato di sostituire i miociti cardiaci danneggiati e, più estesamente, di ripristinare la funzione cardiaca.

Attualmente, sia le cellule embrionali che quelle staminali adulte sono state usate in studi sperimentali di trapianto cellulare cardiaco, mentre solo le cellule staminali adulte (mioblasti scheletrici, cellule mesenchimali derivate dal midollo osseo, cellule precursori endoteliali) sono state impiegate in trials clinici su pazienti. Ciascun tipo cellulare possiede proprietà biologiche uniche che offrono vantaggi e limitazioni al loro uso (6), per cui la selezione delle cellule staminali più appropriate per l'uso nella terapia dell'insufficienza cardiaca ancora un argomento maggiore di ricerca.

I MIOBLASTI SCHELETRICI NELLA TERAPIA RIGENERATIVA CARDIACA

I mioblasti scheletrici o cellule satelliti sono cellule precursori del muscolo scheletrico umano che originano dalle cellule staminali muscolari (14). Normalmente essi sono in stato quiescente al di sotto della membrana basale delle fibre muscolari ed hanno la capacità di rientrare nel ciclo di moltiplicazione cellulare in risposta ad un danno, differenziandosi in cellule muscolari funzionali. I mioblasti scheletrici possono essere ottenuti dagli stessi pazienti, evitando la problematica della terapia immunosoppressiva e controversie etiche. Altri vantaggi teorici comprendono la loro rapida espansione in coltura e la loro bassa tendenza a formare neoplasie dopo l'impianto. Inoltre queste cellule hanno la possibilità di innestarsi tra i cardiomiociti nativi e di sopravvivere in regioni infartuate del cuore grazie ad una relativa resistenza all'ischemia ed al fatto che la densità dei capillari nel muscolo scheletrico è simile a quella del miocardio infartuato.

Studi sperimentali su animale hanno dimostrato che i mioblasti scheletrici possono in seguito all'impianto stabilizzarsi in aree di pregresso infarto miocardico, formando fibre muscolari striate con dischi intercalari nel miocardio ospite sotto l'effetto di fattori specifici (15). Il miglioramento nella funzione sistolica è stato notato dopo trapianto di mioblasti scheletrici in modelli sperimentali di insufficienza cardiaca ischemica e non ischemica, con risultati indipendenti dai metodi strumentali di valutazione, dal tipo di animale da esperimento o dal metodo di inoculazione delle cellule nel miocardio. Hagege e coll. hanno pubblicato dati che confermano la grande resistenza all'ischemia di tali cellule che sarebbe alla base della loro sopravvivenza e della loro differenziazione in cellule simili ai miociti dopo l'impianto in aree cicatriziali post-infartuali (16). Recenti studi hanno dimostrato che alcuni mioblasti trapiantati rimangono cellule precursori che potenzialmente agiscono per costituire nuovi cardiomiociti nell'eventualità di danni futuri (17).

Vi sono ancora controversie riguardo ai risultati promettenti riportati da studi preclinici. Dati sperimentali hanno evidenziato che i mioblasti originanti dal muscolo scheletrico non esprimono le proteine N-caderina e gap-connexina 43 che partecipano all'accoppiamento elettromeccanico tra i cardiomiociti. (18). Come migliorare tale tipo di connessione è ancora materia di studio e ricerca: studi in corso stanno valutando la possibilità di impiegare tecnologie di ingegneria genetica volte ad incrementare l'espressione delle proteine di connessione.

Un sufficiente apporto ematico e di sostanze nutritive nell'area dell'impianto cellulare appare un punto fondamentale nell'integrazione dei mioblasti con i cardiomiociti nativi e per il conseguente miglioramento della funzione contrattile cardiaca. Suzuki e coll. hanno transfettato mioblasti scheletrici di ratto con geni umani VEGF 165 e quindi hanno iniettato tali cellule in cuori di ratto singenici un'ora dopo l'occlusione iatrogena della coronaria sinistra. L'ipotesi di lavoro era che l'incremento nel microcircolo dovuto ai fattori angiogenici addizionali potesse provvedere ad un maggior apporto ematico alle cellule impiantate. Infatti i risultati di questo studio hanno dimostrato che l'espressione miocardica di VEGF era incrementata per due settimane nel gruppo di studio rispetto ai controlli, con il risultato di una angiogenesi migliorata. In termini clinici questo dato si concretizzava in una riduzione significativa della dimensione dell'area infartuale nel gruppo VEGF con un miglioramento nella funzione cardiaca (19). Dunque l'associazione del trapianto cellulare con la terapia genica potrebbe essere un nuovo potenziale approccio nel settore della terapia rigenerativa.

I risultati promettenti derivati dagli studi sperimentali su animale hanno portato a diversi trials clinici non randomizzati con l'impiego di mioblasti scheletrici nella terapia dell'insufficienza cardiaca. Menasché e coll. per primi riportarono il caso di un paziente affetto da insufficienza cardiaca sottoposto ad impianto di mioblasti scheletrici

autologhi nella zona del pregresso infarto miocardico durante un intervento di rivascolarizzazione coronarica. Cinque mesi dopo essi riportarono la presenza di vitalità e di contrazione nell'area cicatriziale con l'esecuzione di esami ecocardiografici e tomografia ad emissione di positroni (PET) (20). Gli stessi autori pubblicarono successivamente un altro studio relativo a 10 pazienti affetti da disfunzione ventricolare sinistra severa post-infartuale trattati con impianto di mioblasti autologhi in corso di bypass coronarico. Dopo un follow-up medio di 10,9 mesi la classe funzionale NYHA (New York Heart Association) media risultava migliorata significativamente da $24\pm 1\%$ a $32\pm 1\%$. Il 63% delle aree infartuate iniettate mostrava un miglioramento nella contrazione. Nonostante tali risultati, nel follow-up, 4 pazienti riportarono complicanze legate all'insorgenza di aritmie ventricolari sostenute che richiesero l'impianto di un defibrillatore definitivo ed 1 paziente morì per una causa non cardiaca (21). Questo studio ha mostrato il pericolo legato al potenziale aritmogenico dei mioblasti scheletrici nonostante la provata fattibilità del loro trapianto.

Herreros e coll. (22) hanno confermato la fattibilità e la sicurezza del trapianto di mioblasti scheletrici autologhi via iniezione diretta intramiocardica durante bypass coronarico. Dodici pazienti con pregresso infarto miocardico e malattia coronarica ischemica sono stati arruolati e le cellule sono state iniettate tre settimane dopo essere state poste in coltura. A 3 mesi di follow-up, l'ecocardiografia ha mostrato un miglioramento significativo della frazione d'eiezione da $35.5\pm 2.3\%$ a $53.5\pm 4.9\%$ ed un aumento nella contrattilità regionale nei segmenti iniettati con i mioblasti. La ^{18}F -FDG-tomografia ad emissione di positroni quantitativa ha confermato un significativo incremento della vitalità cardiaca nell'area infartuata, seppure la ^{13}N -ammonio-PET non ha trovato significatività statistica. Sebbene in questo studio gli autori non abbiano

riportato eventi aritmici maggiori, essi riconoscono la possibilità che aritmie ventricolari possano svilupparsi nel follow-up a lungo termine.

Pagani e coll. (23) hanno riportato i loro risultati sull'analisi istologica dei cuori espianati da pazienti con malattia cardiaca terminale che erano stati sottoposti a trapianto di mioblasti scheletrici autologhi associato ad impianto di un sistema di assistenza ventricolare. Usando come sonda un anticorpo contro la catena pesante della miosina muscolo scheletrico specifica, questo gruppo di ricercatori ha trovato che i mioblasti impiantati erano sopravvissuti e si erano differenziati in miofibre mature in tre dei quattro cuori espianati. Un incremento nella formazione dei vasi è stato osservato in uno dei tre pazienti nell'area con miotubuli sopravvissuti ma non nel tessuto adiacente dove non si era repertata alcuna cellula trapiantata. Anche questo studio ha dimostrato la fattibilità del trapianto di mioblasti per la riparazione nel miocardio danneggiato nell'uomo.

I principali studi clinici di fase I con l'impiego di mioblasti scheletrici sono riportati nella Tabella 1.

Il piccolo numero di pazienti studiati, tuttavia, associato con l'assenza di gruppi di controllo e l'effetto confondente di concomitanti procedure di rivascolarizzazione richiedono ulteriori studi per confermare conclusioni sull'efficacia di tale procedura.

Tabella 1: Terapia cellulare con i mioblasti scheletrici autologhi in pazienti con cardiomiopatia dilatativa ischemica

<u>Autore</u>	<u>Anno</u>	<u>N. pz</u>	<u>LVEF</u>	<u>Dose</u>	<u>Tempo dopo IMA</u>	<u>Obiettivi</u>
Menasché	2003	10	24±4%	8.7±1.9x10 ⁸	3-228 mesi	Regional wall motion. Global LVEF.
Herreros	2003	11	36±8%	1.9±1.2x10 ⁸	3-168 mesi	Regional wall motion. Global LVEF. Vitalità nell'area infartuata
Siminiak	2004	10	25-40%	0.04-5x10 ⁷	4-108 mesi	Regional wall motion. Global LVEF.
Chachques	2004	20	28±3%	3±0.2x10 ⁸	NR	Regional wall motion. Global LVEF. Vitalità nell'area infartuata
Gavira	2005	12 vs 14	35±2.3%	5x10 ⁷	> 4 settimane	Regional wall motion. Global LVEF. Vitalità nell'area infartuata

PLASTICITA' DELLE CELLULE STAMINALI CARDIACHE ADULTE

Con il progredire della ricerca sulle cellule staminali, molti studi hanno rivelato la presenza di cellule staminali in tessuti somatici adulti, incluso il miocardio. I ricercatori hanno esaminato, a tal proposito, la plasticità delle cellule staminali adulte, cioè la capacità di tali cellule provenienti da un tessuto di generare tipi cellulari specializzati di un altro tessuto (9). Alcuni studiosi credono che la plasticità delle cellule staminali dipenda dal microambiente circostante, la cosiddetta nicchia delle cellule staminali (24). I fattori cellulari nella nicchia della cellula staminale danno origine alla differenziazione ed aiutano a stabilire la comunicazione tra le cellule. Alcune cellule staminali adulte sono capaci di essere “geneticamente riprogrammate” per generare cellule specializzate che sono caratteristiche di tessuti differenti (25). Eglitis e Mezey hanno riportato che le cellule ematopoietiche derivate dal midollo osseo generano microglia e macroglia nel cervello di topo adulto in specifiche condizioni sperimentali (26). È stato altresì dimostrato che il trapianto di cellule derivate dal midollo osseo induce angiogenesi e che, se le cellule midollari vengono messe in coltura in un terreno contenente 5-azacitidina, esse hanno la capacità di differenziarsi in cellule simili a quelle cardiache, sia in coltura che in vivo, nel tessuto cicatriziale postinfartuale miocardico e di migliorarne la funzione contrattile (27). Uno studio condotto da Condorelli ha altresì trovato che le cellule endoteliali si differenziano in muscolo cardiaco quando esse vengono messe in coltura con altri cardiomiociti (28).

Yeh e coll. (29) hanno iniettato cellule CD34⁺ del sangue periferico umano adulto attraverso le vene della coda di topi SCID con infarto miocardico. Due mesi dopo, cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce recanti antigeni di

istocompatibilità umani (HLA) sono stati identificati nelle regioni infartuate e periinfartuali nel miocardio dei topi. Sebbene non vi sia l'evidenza che provi che le cellule staminali adulte possano rigenerare tutti i tipi cellulari nell'organismo, la loro apparente plasticità fa nuova luce sulla terapia di trapianto cellulare. Recentemente, comunque, Murry e coll. non hanno confermato che le cellule staminali derivate dal midollo si transdifferenziano in cardiomiociti ed hanno osservato che i cuori in cui sono state iniettate cellule staminali non mostrano la presenza di cardiomiociti derivati da cellule staminali ematopoietiche, rispetto ai controlli (30). Questo studio indica che le cellule staminali ematopoietiche non possono generare prontamente un fenotipo cardiaco e solleva una nota di precauzione per gli studi clinici di riparazione post-infartuale.

LE CELLULE STAMINALI MIDOLLARI E LA RIGENERAZIONE CARDIACA

a) Generalità

Il midollo osseo è conosciuto essere un eccellente reservoir di molte cellule staminali adulte, ed infatti le cellule staminali adulte da esso derivate sono state usate per trattare disordini ematologici da molto tempo. Recenti studi hanno dimostrato che tali cellule sono capaci di attraversare i confini delle linee cellulari e di transdifferenziarsi in epatociti, cellule endoteliali, muscolo scheletrico, e neuroni sotto opportuna stimolazione (31). Sebbene la capacità delle cellule staminali adulte derivate dal midollo osseo di transdifferenziarsi in cardiomiociti rimanga altamente controversa, molti dei recenti progressi nella ricerca rigenerativa cardiovascolare, sia in animale che negli esseri umani, è stata ottenuta usando popolazioni cellulari derivate dal midollo

osseo, incluse le cellule staminali ematopoietiche, le cellule staminali mesenchimali e le cellule progenitrici endoteliali.

Le cellule staminali ematopoietiche possono essere isolate dalle cellule del midollo osseo attraverso una selezione effettuata per la presenza di una particolare espressione di recettori di superficie (Lineage⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺, CD34^{lo}, CD38^{hi}) e rappresentano il prototipo di una popolazione di cellule staminali adulte. Nonostante il fallimento degli studi volti a fornire prove definitive della differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche in cardiomiociti in vitro, diversi studi nel topo hanno dimostrato la potenzialità di tali cellule di differenziarsi in cardiomiociti o cellule vascolari dopo un danno miocardico in vivo (32-34).

All'interno della stroma del midollo osseo risiede anche una sottopopolazione di cellule non ematopoietiche che hanno la potenzialità di differenziarsi in cellule di origine mesenchimale. Tali cellule rappresentano circa dallo 0.001% allo 0.01% della popolazione totale cellulare nucleata midollare, una concentrazione 10 volte inferiore a quella delle cellule ematopoietiche. Le cellule staminali mesenchimali sono autorigeneranti ed espandibili in vitro usando tecniche standard di coltura cellulare. Immunofenotipicamente, tali cellule non esprimono i tipici markers antigenici ematopoietici CD45, CD34 e CD14, ma esprimono invece specifiche molecole di adesione (ALCAM/CD44) ed altri antigeni (SH2, SH3, SH4, STRO-1) (35). All'inizio, si riteneva che le cellule staminali mesenchimali contribuissero soltanto alla formazione del microambiente stromale del midollo osseo e che mantenessero la sopravvivenza e la funzione delle cellule staminali ematopoietiche. Successivamente, altri studi hanno suggerito che le cellule mesenchimali sono capaci esse stesse di multipotenzialità, differenziandosi in condrociti, osteoblasti, astrociti, neuroni, muscolo scheletrico e cardiomiociti (36-38).

Infine i progenitori endoteliali rappresentano una sottopopolazione di cellule staminali ematopoietiche che sono capaci di acquisire un fenotipo endoteliale in vitro (39-41). Le cellule progenitrici endoteliali esprimono i markers cellulari staminali ematopoietici CD133 e CD34 ed il marker endoteliale VEGFR-2 (40). Tali cellule possono essere isolate direttamente dal midollo osseo oppure dal sangue periferico e quindi espanse in vitro.

b) Omeostasi cellulare cardiaca in condizioni fisiologiche e patologiche

L'identificazione di cellule progenitrici residenti cardiache evoca una nuova comprensione dei meccanismi per cui il cuore adulto può mantenere l'omeostasi cellulare. E' ancora argomento di discussione se l'omeostasi cellulare cardiaca sia mantenuta esclusivamente da cellule staminali/progenitrici endogene oppure tramite fonti extracardiache, in pratica da cellule staminali derivate dal midollo osseo. In particolare, l'osservazione di cellule ospiti maschili in pazienti maschi trapiantati con cuori femminili suggerisce il ruolo potenziale di cellule staminali extracardiache nel turnover delle cellule cardiache (42). E' stato proposto che il chimerismo osservato negli esseri umani possa risultare da cellule progenitrici residenti negli atri nativi che vengono lasciati in situ durante il trapianto cardiaco e non da cellule staminali circolanti derivanti dal midollo osseo (43). Dati più recenti in modelli animali hanno suggerito comunque che le cellule staminali derivate dal midollo contribuiscono poco nel mantenere l'omeostasi delle cellule cardiache durante la crescita postatale normale come pure nell'età adulta fisiologica (44).

Al contrario, le cellule staminali derivate dal midollo osseo giocano un ruolo significativo nel mantenere l'omeostasi cellulare cardiaca, incluso il turn-over delle

cellule cardiache staminali, nella cardiomiogenesi e nella angiogenesi, dopo un danno miocardico (44-45). E' stato dimostrato la capacità delle cellule staminali midollari di differenziazione in cardiomiociti, sebbene a bassa frequenza, nonché la capacità di angiogenesi dopo infarto miocardico (34). Inoltre, usando un modello sperimentale animale con cellule midollari marcate, si è anche scoperto che cellule staminali derivate dal midollo si localizzano in aree di miocardio danneggiato dopo tre giorni da un infarto (46). Queste cellule non soltanto contribuiscono attivamente alla riparazione miocardica ma anche partecipano alla ricostruzione del pool di cellule progenitrici cardiache (32-33, 47-48).

Ciò è supportato da lavoro addizionale recente dove sono stati usati modelli genetici di topo per dimostrare un incremento delle cellule c-kit+, reclutate dal midollo osseo, dopo infarto miocardico (44). Inoltre, usando un modello di ratto di trapianto cardiaco da donatore di sesso diverso dal ricevente, Wang e coll. hanno evidenziato che le cellule staminali derivate dal midollo sono attratte nelle aree di danno ischemico miocardico e partecipano alla riparazione cardiaca (45). Questi dati sperimentali sono stati ulteriormente supportati da osservazioni su trapianti cardiaci umani con mismatch sessuale, che suggerisce che maggior chimerismo cardiaco possa verificarsi in pazienti con infarto miocardico (49). In conclusione, la letteratura corrente suggerisce che il danno cardiaco possa servire come necessario e potente fattore stimolante per il reclutamento e la potenziale differenziazione cardiomiogenica di cellule staminali midollari endogene.

c) Mobilizzazione ed homing delle cellule staminali derivate dal midollo osseo

E' ben riconosciuto che, nonostante l'esistenza di cellule staminali/progenitrici cardiache, questa capacità rigenerativa endogena è insufficiente per mediare la riparazione d'organo dopo un severo danno cardiaco. Quindi, la capacità del miocardio danneggiato a reclutare cellule staminali extracardiache dopo un danno è un punto critico nella riparazione e rigenerazione miocardica. Almeno tre compartimenti maggiori si pensa che regolino questi complicati meccanismi: il miocardio danneggiato, il midollo osseo e la circolazione periferica. Il miocardio danneggiato è responsabile del rilascio di segnali attraverso il sangue periferico per la mobilitazione di cellule staminali extracardiache dal reservoir maggiore, il midollo osseo. Dopo la mobilitazione, queste cellule staminali sono allora capaci di seguire una traccia marcata da specifici segnali, quindi di uscire dalla circolazione ematica e di stabilizzarsi in siti miocarditi danneggiati per iniziare il processo riparativo. Questi tre elementi devono lavorare insieme per ottenere una riparazione ed una rigenerazione mediata dalle cellule staminali che sia efficace.

La precisa cronologia, la cinetica ed i fattori stimolanti il midollo osseo rimangono oggetto di intensa ricerca; comunque, diversi fattori sono stati evidenziati come cruciali nella mobilitazione delle cellule staminali derivanti dal midollo nella circolazione periferica, incluso il granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), il granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, lo stem cell factor (SCF), il vascular endothelial growth factor (VEGF), lo hepatocyte growth factor e la eritropoietina (EPO).

L'ischemia miocardica è nota indurre la produzione di citochine favorenti la mobilitazione di cellule staminali incluse il G-CSF (50), il VEGF (51), l'SDF-1 (52) e l'EPO (53); queste citochine possono essere responsabili dell'osservato homing delle cellule staminali derivate dal midollo osseo dopo infarto miocardico acuto. La

mobilizzazione di cellule precursori endoteliali tramite citochine stimolanti incrementa la concentrazione di tali cellule nel sangue periferico in maniera sostanziale (53). Inoltre anche le statine hanno dimostrato di promuovere il reclutamento di cellule precursori endoteliali (54). Inoltre, data la capacità delle cellule staminali derivate dal midollo osseo di localizzarsi nei siti di danno, è stato suggerito che la mobilizzazione di tali cellule attraverso citochine di stimolo somministrate per via sistemica possa rappresentare una strategia meno invasiva per attivare e liberare cellule staminali dopo un infarto miocardico acuto. Dunque queste citochine ed i loro rispettivi recettori possono essere l'obiettivo di manipolazioni potenziali per ottenere una riparazione cardiaca cellulo-basata funzionalmente efficace.

Lo stem cell factor (SCF) è un ligando per il c-kit, un recettore espresso nelle cellule staminali e nelle cellule progenitrici tissutali, incluse le cellule staminali residenti cardiache. Come il G-CSF ed il granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, lo SCF è un fattore ematopoietico che è ben noto regolare la proliferazione, la differenziazione ed la sopravvivenza delle cellule staminali derivate dal midollo osseo. Orlic è stato il primo ad usare una terapia combinata con G-CSF e SCF in un modello murino di infarto miocardico e a dimostrare un miglioramento significativo nel rimodellamento ventricolare, nella funzione cardiaca e nella sopravvivenza degli animali con 5 giorni di trattamento (33). Il migliorato esito è stato associato ad una significativa cardiomiogenesi derivata dal midollo osseo. Questi risultati, comunque, non sono stati riprodotti in un altro studio in cui G-CSF e SCF furono somministrati in un'unica dose 4 ore dopo un infarto sperimentale in primati (55).

Sebbene il G-CSF e lo SCF/c-kit rappresentino fattori importanti per il reclutamento di cellule staminali derivate dal midollo osseo dopo infarto miocardico, i risultati attuali da vari gruppi sono controversi sia nell'appropriato timing della somministrazione di

citochine sia nella dose e nel modello sperimentale usato. Nonostante ciò, la migliore prova dimostrante l'importanza ed il coinvolgimento dell'asse SCF/c-kit nella mobilizzazione del midollo osseo e nella riparazione cardiaca è stata ottenuta con un modello transgenico di topo con iperespressione di un c-kit mutante (kit^w/kit^{w-v}) (44). Nei topi kit^w/kit^{w-v} la mobilizzazione e la localizzazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo nel cuore sono risultate marcatamente danneggiate dopo infarto miocardico, nonostante elevati livelli circolanti di SCF. Tale deficienza esita ulteriormente in insufficienza cardiaca precoce e decesso. Interessante è la evidenza che il processo di disfunzione d'organo può essere invertito dal trapianto di cellule midollari di ceppo originario non mutante, che consentirebbe il recupero della capacità per l'homing delle cellule staminali derivate dal midollo osseo. La manipolazione dell'asse SCF/c-kit per benefici clinici rimane un obiettivo del futuro.

I MECCANISMI POTENZIALI DELLA RIPARAZIONE/RIGENERAZIONE MIOCARDICA MEDIATA DALLE CELLULE STAMINALI

Nella ultima decade, molti gruppi hanno usato uno spettro di popolazioni cellulari staminali derivate dal midollo osseo, incluso il midollo osseo intero, le cellule staminali ematopoietiche, quelle mesenchimali e i precursori endoteliali, nel trattamento dell'insufficienza cardiaca post infartuale sia in modelli animali che in trials clinici nell'uomo. Appare interessante che, sebbene soltanto pochi gruppi abbiano osservato una differenziazione delle cellule staminali derivate dal midollo osseo in cardiomiociti, la maggior parte dei gruppi abbia comunque riportato un effetto benefico sul rimodellamento post-infartuale. In considerazione dell'obiettivo centrale di migliorare la funzione cardiaca e quindi l'outcome clinico dei pazienti, le terapie cellulari possono

essere efficaci non soltanto nella rigenerazione del miocardio perso, tramite una diretta transdifferenziazione, ma anche nella protezione del miocardio vitale esistente o nella riparazione del miocardio danneggiato, tramite effetti paracrini.

a) Transdifferenziazione delle cellule staminali

Usando markers genetici e/o marcanti fluorescenti, diversi gruppi hanno riportato la transdifferenziazione di cellule staminali ematopoietiche derivate dal midollo osseo in cardiomiociti (32-34), mentre altri ricercatori hanno fallito in tale dimostrazione (30, 56-57). Anche sulla capacità delle cellule mesenchimali di transdifferenziarsi in vivo ed in vitro in senso cardiomiogenico sono stati pubblicati lavori di parere diverso (27, 58). Inoltre molti studi hanno suggerito che la fusione cellulare, più che la transdifferenziazione delle cellule derivate dal midollo osseo possa spiegare le modificazioni fenotipiche osservate (59-60).

Indipendentemente dal meccanismo responsabile, è generalmente condiviso che il numero dei cardiomiociti riportati provenienti da cellule staminali derivate dal midollo somministrate dall'esterno rimane relativamente basso e non può spiegare fisicamente il riportato miglioramento funzionale osservato. Un'alternativa proposta è quella basata su effetti paracrini mediati dalle cellule staminali. In contrasto all'ipotesi cardiomiogenetica, inoltre, la maggior parte dei gruppi ha osservato un possibile contributo delle cellule staminali midollari alla neoangiogenesi, osservazione fatta da Asahara 10 anni fa e confermata da altri laboratori di ricerca (61-63). Infine, un meccanismo alternativo con cui le cellule staminali midollari possono contribuire alla riparazione miocardica è attraverso il mantenimento del pool di cellule staminali cardiaco-specifiche dopo un danno. Le cellule staminali midollari localizzandosi nel

miocardio dopo un danno vanno incontro a modificazioni fenotipiche per adattarsi al fenotipo di cellula cardiaca residente. Tali cellule potrebbero contribuire alla capacità del cuore per la riparazione endogena a lungo termine.

b) Effetti paracrini

Come suggerito sopra, gli effetti benefici della terapia cellulare sulla funzione cardiaca rimangono sproporzionati al grado di differenziazione cardiomiogenica. Tali osservazioni hanno condotto all'ipotesi che gli effetti potenziali paracrini possano giocare un ruolo importante nella terapia rigenerativa. Tali effetti includono la secrezione di fattori che possono attenuare l'apoptosi dei cardiomiociti endogeni (64) e delle cellule endoteliali (65), la promozione dell'angiogenesi (66), e l'attivazione delle cellule staminali cardiache residenti. Inoltre, le cellule staminali mesenchimali possono anche produrre fattori angiogenici come il VEGF ed il basic fibroblast growth factor e fattori chemiotattici incluso il monocyte chemoattractant protein I ed il placental growth factor, che servono al reclutamento di monociti ed alla neoangiogenesi.

Sebbene l'ipotesi paracrina della terapia cellulare rigenerativa sembra razionale in considerazione delle precedenti osservazioni, rimane un campo inesplorato con un ampio supporto di evidenza indiretta.

IMPIEGO POTENZIALE DELLE CELLULE STAMINALI DERIVATE DAL MIDOLLO OSSEO NELLA INGEGNERIA TISSUTALE.

L'ingegneria tissutale è una scienza in rapida evoluzione che integra i principi dell'ingegneria e della tecnologia integrandoli in una innovazione biologica volta allo

sviluppo della sostituzione tissutale. Il concetto base è che uno scaffold viene usato per fornire una piattaforma dalla quale un tessuto può crescere. Una volta che lo scaffold è formato, le cellule possono essere insemiante direttamente su di esso e lasciate in uno specifico “bioreattore” che provvede le cellule di nutrienti e di ossigeno.

L’ingegneria tissutale delle strutture cardiovascolari, incluse valvole, condotti vascolari, e patches vascolari offre diversi vantaggi potenziali oltre le opzioni di sostituzione attuali. Anzitutto, le strutture derivate da tale metodica hanno la capacità di crescere e di rimodellarsi nel tempo perché sono costruite da cellule viventi. In teoria, questa caratteristica potrebbe consentire ad una valvola impiantata o ad un vaso di sopravvivere per un periodo molto più lungo rispetto ai prodotti attualmente impiegati, e di eliminare la necessità di ripetute operazioni correlate alla degenerazione del tessuto o del device. Un altro vantaggio potenziale delle strutture tissue-engineered è che esse comportano un rischio molto ridotto di rigetto dell’impianto da parte del sistema immune del paziente in quanto le cellule derivano dallo stesso paziente ricevente il neo-tessuto. Un terzo potenziale beneficio è il rischio ridotto di formazione di trombi e di infezione perché la superficie cellulare in contatto con il sangue teoricamente si comporta similmente alle cellule endoteliali native. Conseguentemente, la terapia anticoagulante potrebbe essere evitata.

Ci sono tre principali strategie terapeutiche di tissue engineering che possono essere usate per trattare tessuti danneggiati o distrutti nei pazienti: l’impianto di cellule fresche isolate o in coltura; l’impianto di tessuti formati in vitro da cellule e scaffold; e la rigenerazione tissutale in situ (68). Per l’impianto cellulare, le cellule individuali del donatore/paziente possono essere iniettate sia direttamente nel tessuto danneggiato o combinate con uno scaffold degradabile in vitro ed impiantate. L’impianto tissutale coinvolge la crescita in vitro di un tessuto completo tridimensionale usando cellule del

paziente o donatore ed uno scaffold impiantato fino a raggiungere “maturità”. La rigenerazione in situ consiste di uno scaffold che è direttamente impiantato nel tessuto danneggiato al fine di stimolare le cellule del proprio organismo a promuovere la riparazione tissutale locale.

Le principali fonti cellulari che sono state usate per l’impianto possono essere divise in tre principali gruppi: cellule autologhe del paziente; cellule allogeniche da un donatore umano che non è immunologicamente identico al paziente; e cellule xenogeniche da una specie differente. Ciascuna di queste categorie può essere suddivisa a seconda se le cellule sono adulte in origine o cellule embrionali capaci di autoreplicazione e differenziazione in una varietà di linee cellulari, o una miscela di cellule differenziate a diversi stadi di maturazione, incluse sia le cellule staminali primitive che le cellule progenitrici più mature.

Tutti gli approcci precedentemente descritti sono basati su sorgenti cellulari derivate dalla parete dei vasi, che pongono svantaggi per l’ingegneria tissutale delle valvole cardiache e del miocardio danneggiato. Il principale inconveniente dell’uso delle cellule derivate dalla parete vasale è che esse dimostrano diverse caratteristiche, comparate ai tipi cellulari valvolari ed a quelli miocardio-specifici, e queste caratteristiche possono essere limitanti nello sviluppo e nella funzione di valvole cardiache o cardiomiociti tissue engineered (69).

Il continuo progresso nel campo dell’ingegneria tissutale è diretto ad identificare una sorgente di semplice accessibilità ed applicabilità clinica per cellule dalle quali costruire valvole cardiache, vasi ematici e miocardio danneggiato. Le cellule staminali hanno un potenziale enorme nel trattamento di tessuti danneggiati in organi come il cuore, in cui la sorgente locale di cellule per la riparazione è estremamente limitata o non facilmente accessibile. Alcune popolazioni cellulari provenienti dal midollo osseo, come le cellule

steminali mesenchimali, sono state isolate dai pazienti, espanse in coltura ed indotte a differenziarsi in cellule che possono aiutare a riparare il midollo danneggiato, la cartilagine, i tendini ed i legamenti. L'uso delle cellule derivate dal midollo offre diversi vantaggi sulle altre correnti fonti di cellule, inclusa la facilità di procurarle tramite una puntura del midollo osseo evitando il sacrificio di una struttura vascolare intatta come pure il fatto che le cellule del midollo osseo hanno la potenzialità di differenziarsi più facilmente in linee cellulari multiple. Le cellule del midollo osseo hanno anche dimostrato caratteristiche immunologiche uniche che consentono loro di persistere in settings allogeni (70). In una maniera simile, il tessuto cardiaco neonatale trapiantato, esprimente antigeni ABO incompatibili con gli antigeni del ricevente è tollerato dall'ospite come riflesso di una risposta immunitaria immatura durante la prima infanzia.

a) Valvole cardiache

La sostituzione valvolare è la terapia più comune per la malattia cardiaca valvolare terminale nel mondo. Sebbene la chirurgia sostitutiva valvolare con protesi meccaniche o biologiche ha dimostrato di modificare sostanzialmente il corso della malattia valvolare, vi sono numerosi problemi correlati a tale procedura. Ciascuna delle tre principali metodiche di sostituzione valvolare attualmente in uso, protesi meccaniche, protesi biologiche ed homografts originanti da cadaveri donatori, hanno le proprie limitazioni e sono associate a complicanze quali la durata limitata, la trombogenicità e l'alterato profilo emodinamico. Le principali limitazioni associate alla sostituzione con le protesi meccaniche includono la necessità della terapia anticoagulante a vita, la

possibilità di eventi tromboemorragici ed una incrementata vulnerabilità del paziente alle infezioni.

Come risultato di tali considerazioni, i cardiocirurghi hanno sperimentato nuove tecniche riparative valvolari; tuttavia, molte valvole non sono suscettibili di riparazione chirurgica e quindi lo sforzo crescente di creare sostituti valvolari vivi con le tecniche dell'ingegneria tissutale appare giustificato.

Il campo dell'ingegneria tissutale cardiaca ha fatto sforzi tremendi verso la produzione di valvole cardiache funzionali. Cellule endoteliali di pecora e miofibroblasti inseminati in scaffolds polimerici e coltivati in vitro in un bioreattore che ripropone una situazione pressoria simile a quella fisiologica sistolica hanno portato alla formazione di una valvola cardiaca di pecora funzionale per 5 mesi in vivo (71). In altri studi, cellule derivanti dalla parete della arteria carotide sono state usate con successo per costruire strutture cardiovascolari funzionali in modelli animali (72). Più recentemente ricercatori hanno usato cellule del midollo osseo per costruire valvole cardiache. Hoerstrup e coll. hanno inseminato valvole aortiche tricuspidi costruite da polimeri rapidamente bioassorbibili con cellule mesenchimali, permettendo alle cellule di crescere in vitro in un bioreattore a flusso pulsato. Dopo 14 giorni di coltura, le valvole costruite con cellule staminali mesenchimali apparivano intatte, mobili, con lembi elastici e funzionali garantenti la continenza della valvola in fase di chiusura, anche in condizioni di flusso e pressioni ultrafisiologici (70). Analoghi risultati sono stati ottenuti da Sutherland e coll. (73) che hanno riportato una buona funzione ecocardiografica di valvole bioingegnerizzate inserite in posizione polmonare in un modello sperimentale su pecora, fino a 8 mesi dopo l'impianto. Anche in tal caso gli autori avevano impiegato cellule staminali mesenchimali e uno scaffold biodegradabile. Sebbene tali prodotti abbiano dimostrato molte delle caratteristiche della differenziazione in senso

miofibroblastico, essi non ripropongono la classica composizione a triplo strato dei lembi valvolari nativi distinta in ventricolare, spongiosa e fibrosa. La futura ricerca con l'uso delle cellule derivate dal midollo osseo nell'ingegneria delle valvole cardiache richiederà l'ottimizzazione delle condizioni di flusso e di pressione di carico, e sarà diretta verso l'esame in vivo in modelli animali per valutare la durata di tali prodotti a breve e medio termine.

b) Vasi sanguigni

Il bypass coronarico e quello vascolare periferico nella terapia della malattia cardiovascolare sono stati realizzati routinariamente per decenni. Le procedure di rivascularizzazione coronarica attualmente sono basate sull'impiego di condotti arteriosi e venosi autologhi, mentre le vene safene o quelle dell'arto superiore rimangono il materiale di scelta per eseguire bypass vascolari periferici. Spesso grafts sintetici sono impiegati in caso di indisponibilità di condotti del paziente, sia perché già utilizzati sia perché di scarsa qualità. Inoltre, sebbene sia i condotti nativi che i sintetici vengano impiegati nei casi di intervento su vasi di grande calibro, soltanto i grafts protesici sono disponibili per i vasi di piccolo diametro a basso flusso. Tali grafts sono composti di materiale come il Dacron o il politetrafluoroetilene espanso. Nonostante la pervietà di tali condotti vari tra l'85 ed il 90% quando applicati su vasi di ampio calibro, i grafts protesici di diametro inferiore ai 5 mm sono gravati da malfunzionamento in quanto suscettibili a fenomeni di trombosi, calcificazione e crescita dell'intima o della pseudointima nel sito di anastomosi. Tali complicazioni portano all'occlusione del graft, in genere come conseguenza del mismatch tra il graft ed il vaso nativo.

Il graft vascolare protesico ideale dovrebbe riproporre da vicino gli attributi del vaso nativo, in quanto dovrebbe essere duraturo, resistente alla trombosi, infiammazione e proliferazione dell'intima. Il graft dovrebbe essere anche disponibile in una ampia varietà di diametri al fine di permettere un'ampia gamma di interventi ricostruttivi cardiaci e vascolari. Inoltre il graft ideale dovrebbe diventare metabolicamente e biochimicamente simile ad un vaso nativo.

Nonostante i primi tentativi di impiego di tali prodotti (74-75) rappresentino un notevole progresso verso l'applicazione clinica, vi sono ancora delle limitazioni tipiche dei tessuti costruiti con l'ingegneria tissutale. Il maggior limite è che l'uso delle cellule vascolari periferiche richiede il sacrificio di strutture vascolari donatrici intere. Nel 2002, Hoerstrup e coll., in cerca di un approccio alternativo, hanno dimostrato la fattibilità di costruire condotti polmonari viventi usando cellule di cordone ombelicale e uno scaffold rapidamente bioassorbibile (76). In uno studio più recente, altri ricercatori hanno riportato un nuovo approccio basato esclusivamente sull'uso delle cellule mesenchimali umane in coltura.

Tali studi hanno contribuito significativamente allo sviluppo dei vasi costruiti con metodiche di bioingegneria che hanno la potenzialità di servire come grafts vivi. I prossimi passi nella sperimentazione saranno correlati ad esplorare l'uso potenziale delle cellule staminali derivate dal midollo osseo ed altre fonti di cellule staminali per lo sviluppo di grafts vascolari più applicabili clinicamente.

c) Miocardio

Nonostante i miglioramenti fatti nel trattamento delle malattie cardiache e nel trapianto cardiaco, le metodiche alternative per la riparazione del tessuto cardiaco danneggiato

sono stati studiati molto negli ultimi anni proprio a causa della limitata disponibilità dei donatori d'organo per il trapianto cardiaco. Gli attuali sostituti protesici del miocardio hanno limitazioni legate alla vulnerabilità per infezione, alla trombogenicità ed alla perdita della ottimale capacità contrattile dovuta alla presenza di materiali protesici esterni (77). Durante gli ultimi anni, dunque, il settore emergente dell'ingegneria tissutale ha generato una serie di strategie volte alla costruzione di tessuto miocardico umano vivente sostitutivo.

Sebbene progressi siano stati fatti nel settore, tuttavia, rimane difficile far proliferare il tessuto cardiaco a causa della sua natura quiescente. Infatti lo scaffold usato per generare tessuto miocardico deve essere inseminato con cellule provenienti da altre fonti. Recenti progressi nel campo della plasticità cellulare hanno aumentato l'interesse nelle potenzialità delle cellule staminali e nelle cellule progenitrici estratte dal midollo osseo adulto, proprio nell'uso rigenerativo miocardico.

In pratica il cuore stesso è usato sia come scaffold che come bioreattore, per favorire l'incorporazione delle cellule iniettate in aree di miocardio danneggiato. La cardiomioplastica cellulare è stata tentata con molti tipi cellulari, incluso i cardiomiociti fetali, le cellule staminali embrionali, i mioblasti scheletrici autologhi e le cellule staminali derivate dal midollo osseo.

I mioblasti scheletrici sono stati il primo tipo cellulare ad essere valutato in un situazione clinica e si è dimostrato che essi consentono la formazione di nuovo tessuto somigliante al muscolo cardiaco al sito del danno, con miglioramento della funzione cardiaca (15, 21). Sebbene il trapianto di mioblasti appare fattibile e sicuro, è stato descritto un rischio incrementato di aritmie ed i risultati dell'uso terapeutico appaiono non chiari. I cardiomiociti sarebbero il tipo cellulare ottimale per la riparazione

miocardica, tuttavia i cardiomiociti adulti non sono disponibili a causa della loro incapacità a replicarsi in vivo ed in vitro.

Una fonte alternativa di cellule con eccellente plasticità potenziale sono le cellule staminali derivate dal midollo osseo. Le cellule stromali del midollo sono state trapiantate nell'infarto miocardico in maiali dopo aver indotto la differenziazione in fenotipo miogenico con 5-azacitidina (78). Quattro settimane dopo il trapianto, le cellule hanno dimostrato di formare isole di tessuto simile a quello cardiaco, di indurre angiogenesi, di prevenire assottigliamento e dilatazione della regione infartuata ed hanno dimostrato di migliorare la funzione contrattile globale e regionale.

Sebbene la iniezione diretta o il trapianto di cellule può riparare piccole aree di miocardio danneggiato, la rigenerazione di aree più estese risultanti da ostruzioni coronariche più importanti può richiedere una terapia più estesa. Diversi gruppi stanno lavorando sull'impiego di grafts cardiaci funzionali, costruiti con l'ingegneria tissutale, creati da patches di cardiomiociti cresciuti in laboratorio (79).

Il trapianto di grafts cardiaci costruiti con l'ingegneria tissutale è stata anche ottenuta usando una rete di gelatina biodegradabile come pure scaffolds porosi ed in entrambi i casi essi hanno mostrato una buona integrazione delle cellule impiantate nell'ospite (80). Il progresso fatto nel campo della cardiomioplastica è incoraggiante anche se rimangono difficoltà legate al fatto che, indipendentemente dal tipo cellulare usato, dal metodo di impianto o di somministrazione, la regione infartuata costituisce un complicato microambiente per la sopravvivenza cellulare. Infatti le aree dentro e intorno al miocardio infartuato sono scarsamente perfuse e sono esposte a forze dinamiche ed ad un alterato ambiente biochimico. Questo microambiente tumultuoso può limitare l'attecchimento, l'incorporazione e la sopravvivenza dei tessuti trapiantati. La terapia

genica potrebbe essere importante nel futuro dell'ingegneria tissutale cardiaca mimando la risposta naturale del tessuto nativo verso le cellule impiantate.

Diversi gruppi hanno iniziato ad usare la terapia genica combinata con l'ingegneria tissutale nello sforzo di ottenere le condizioni ottimali per la formazione di nuovo tessuto. Recentemente, un nuovo metodo di terapia rigenerativa miocardica è stato riportato per l'insufficienza cardiaca (81). Questi ricercatori hanno trovato una migliorata performance cardiaca in ratti che hanno ricevuto cardiomiociti neonatali di ratto combinati con liposomi di virus emoagglutinante recanti il gene per il fattore umano di crescita epatocitaria. Tali dati suggeriscono un ruolo importante per la terapia genica associata all'ingegneria del tessuto cardiovascolare.

Negli ultimi anni, dunque, la terapia cellulo-mediata è evoluta in forma esplosiva, dagli studi iniziali in vitro su cellule isolate a modelli animali di infarto miocardico fino a diversi studi clinici di fase I e II. Nella maggior parte di essi le cellule staminali derivate dal midollo osseo rimangono il tipo cellulare più usato a causa della facile accessibilità e delle ben note caratteristiche ematologiche.

I metodi di introduzione delle cellule staminali derivate dal midollo nella pratica clinica includono l'iniezione intramiocardica diretta, sia via iniezione endocardica tramite catetere sia tramite approccio chirurgico epicardico, l'iniezione intracoronarica durante procedura di angioplastica percutanea, la mobilizzazione sistemica di cellule staminali tramite citochine ed infine l'attivazione in situ di progenitori residenti attraverso l'iniezione locale di fattori di crescita e citochine.

La maggior parte dei trials clinici non randomizzati, sebbene designati per definire la sicurezza più che l'efficacia, ha mostrato in maniera incoraggiante un moderato incremento della funzione cardiaca dopo terapia con cellule staminali. Il primo trial randomizzato di cellule staminali derivate dal midollo iniettate per via intracoronarica

durante procedura di angioplastica percutanea, il BOOST I trial, ha dimostrato un iniziale beneficio in termini di miglioramento della frazione di eiezione a sei mesi dopo la terapia cellulare, confermato dalla risonanza magnetica nucleare (82). Tuttavia, a causa del miglioramento continuo nel gruppo di controllo, il beneficio nei pazienti trattati veniva perso ad un follow-up di 18 mesi (83). Due trials clinici più grandi che hanno investigato la somministrazione intracoronarica di cellule staminali midollari sono stati recentemente pubblicati. Nell'ASTAMI trial, un trial randomizzato di 100 pazienti con infarto miocardico acuto, le cellule midollari mononucleate sono state inoculate 6 giorni dopo angioplastica percutanea. A sei mesi nessun miglioramento nella frazione d'eiezione o nella riduzione della dimensione dell'infarto è stato osservato (84). Al contrario, il REPAIR-AMI (85), un trial randomizzato, controllato verso placebo con più di 200 pazienti trattati dopo infarto miocardico, ha evidenziato un piccolo ma significativo miglioramento nella frazione d'eiezione valutato alla ventricolografia. Molte spiegazioni potenziali per queste differenze di risultato evidenziate sono state proposte quali la severità della disfunzione ventricolare pre trattamento, il timing della somministrazione cellulare, ed il metodo dell'isolamento cellulare (qualità delle cellule). La mobilizzazione delle cellule dal midollo osseo rappresenta un'alternativa di terapia cellulare basata sull'impiego cellulare che è stata recentemente investita in trials clinici. Il FIRSTLINE-AMI trial (86) ha dimostrato non soltanto la fattibilità e la sicurezza della mobilizzazione delle cellule staminali midollari usando il G-CSF in pazienti con infarto miocardico dopo riperfusione, ma ha anche suggerito un potenziale miglioramento della frazione d'eiezione ed una attenuazione della dilatazione del ventricolo sinistro. Inoltre questo trial ha mostrato che la somministrazione di G-CSF non ha aumentato la frequenza di restenosi coronariche post PTCA. Studi clinici successivi, randomizzati, controllati verso placebo,

specificamente il REVIVAL II (87) e lo STEMMI (88) hanno fallito nel riprodurre i benefici precedentemente riportati negli studi umani iniziali. Tuttavia questi trials hanno confermato l'assenza di eventi avversi, incluso la restenosi vasale post procedura per cutanea. Le ragioni di questi risultati negativi possono essere ricercate nel possibile dosaggio inappropriato di citochine e nell'inadeguato timing della somministrazione di questi fattori di stimolazione.

Un numero di reports clinici ha descritto effetti vantaggiosi dell'inoculazione intramiocardica di cellule staminali derivate dal midollo osseo associata al bypass coronarico nella terapia chirurgica dell'insufficienza cardiaca di origine ischemica (Tabella 2). Questi studi hanno mostrato che questa tecnica è sicura e consente effetti positive in termini di miglioramento della frazione d'eiezione e di perfusione miocardico anche se il potenziale vantaggio clinico a distanza deve essere confermato con studi basati su un numero più elevato di pazienti controllati in maniera prospettica e randomizzata verso placebo. Inoltre, il meccanismo attraverso il quale le cellule del midollo osseo agiscono sul cuore richiede ulteriori delucidazioni scientifiche.

Tabella 2: Trapianto di cellule staminali derivate dal midollo osseo in pazienti con cardiomiopatia dilatativa ischemica durante bypass coronarico.

<u>Autore</u>	<u>Anno</u>	<u>N. pz</u>	<u>LVEF</u>	<u>Tipo cellulare</u>	<u>Dose</u>	<u>Tempo dopo IMA</u>	<u>Outcome</u>
Hamano	2001	5	NR	BM mononucl. cell	$0.3-2.2 \times 10^9$	NR	Perfusione
Stamm	2004	12	$36 \pm 11\%$	CD 133+	$1-2.8 \times 10^6$	3-12 sett.	LVEF. Perfusione
Galinares	2004	14	NR	BM mononucl. cell	49×10^6	NR	LVEF
Li	2003	6	NR	BM mononucl. Cell	$6-28 \times 10^8$	NR	Safety. Feasibility
Mocini	2006	18 vs 18 contr	$46 \pm 10\%$	CD45+ CD34+ CD133+	$2.9 \pm 2.3 \times 10^8$	< 4 sett.	Global LVEF
Patel	2005	10 vs 10 contr.	$29.4 \pm 3.6\%$	CD34+	2×10^7	NR	LVEF
Stamm	2007	20 vs 20 controls	$37.4 \pm 8.4\%$	CD133+	5.9×10^6	NR	LVEF. Perfusion

PROTOCOLLO DI RICERCA

a) Introduzione

L'ingegneria tissutale sta emergendo come nuovo approccio potenzialmente curativo per la sostituzione del miocardio danneggiato o per la ricostruzione dell'organo a causa di malformazioni congenite. Una popolazione in continua espansione è quella dei pazienti con insufficienza cardiaca congestizia che nella maggior parte dei casi hanno una storia di malattia coronarica aterosclerotica pregressa. Tra i trattamenti alternativi la terapia rigenerativa miocardica con l'impianto di cellule staminali è una nuova terapia potenzialmente utilizzabile per ripopolare il miocardio di miociti funzionali e per promuovere la neovascolarizzazione in aree di miocardio danneggiato.

E' stato ben dimostrato che il midollo osseo è un ricco reservoir di cellule progenitrici e staminali tessuto specifiche. Inoltre diversi studi hanno confermato che le cellule derivanti dal midollo osseo contribuiscono funzionalmente alla neoangiogenesi durante la guarigione delle ferite e l'ischemia periferica, dopo l'infarto miocardico e nell'endotelizzazione di grafts vascolari. Negli esseri umani le cellule mononucleate del midollo osseo autologo sono state già impiantate attraverso iniezioni trans-catetere arteriose o venose, per via transendocardica o per mezzo di inoculazioni epicardiche: in questi studi si è dimostrato un miglioramento della perfusione miocardica e della funzione ventricolare sinistra, suggerendo che l'infusione di cellule progenitrici autologhe può essere una procedura fattibile e sicura con beneficio clinico a breve termine.

Il protocollo di studio è costituito dalla parte sperimentale preclinica di un più ampio protocollo di ricerca di fase I condotto presso la Sezione di Cardiocirurgia del

Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università degli Studi di Parma, volto a valutare la sicurezza e l'efficacia della rivascolarizzazione coronarica associata al trapianto autologo di cellule staminali frazionate del midollo osseo verso la rivascolarizzazione coronarica isolata, nella terapia dei pazienti affetti da insufficienza cardiaca congestizia. Con tale studio si è voluta verificare l'efficacia della differenziazione cellulare in senso endoteliale di cellule staminali derivate dal midollo osseo espanse e coltivate in vitro e la sicurezza e purezza della metodica di laboratorio per l'estrazione in vitro delle cellule CD 133+ derivate dal pool midollare prelevato con puntura di cresta iliaca in pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa ischemica.

b) Materiali e metodi

Tre pazienti con diagnosi di cardiomiopatia dilatativa ischemica con indicazione ad intervento di bypass coronarico sono stati sottoposti il giorno precedente all'intervento chirurgico, previo consenso informato, ad agoaspirato midollare a livello della cresta iliaca mediante ago sterile da biopsia 15G-43mm.

Il sangue midollare ottenuto è stato sottoposto ad arricchimento delle cellule positive al CD133 (AC133) mediante utilizzo del separatore immunomagnetico CliniMACS (Miltenyi, BiotechBergisch Gladbach, Germania). Tale strumentazione, unica approvata dalla Comunità Europea per uso clinico, è a disposizione del laboratorio della Sezione di Ematologia del Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Parma.

La separazione cellulare avviene in sacche sterili a circuito chiuso in quattro passaggi e utilizzando kit monouso sterili specifici per la frazione cellulare da purificare e forniti dalla ditta produttrice. Nel primo passaggio le cellule vengono incubate con anticorpo

monoclonale anti CD133 marcato con microbiglie magnetiche per circa 30 minuti. Successivamente viene attivato il programma di selezione specifico per le cellule CD133 previsto dallo strumento e quindi applicata una sacca con il tubing set di separazione alla macchina e fatta partire la sequenza di separazione. Il sistema Clini MACS si basa sul passaggio della sospensione cellulare marcata con l'anticorpo specifico attraverso una colonna nella quale vengono generati campi magnetici mentre le cellule negative non marcate scorrono e confluiscono nella sacca di raccolta della frazione negativa. Il sistema esegue varie fasi di lavaggio smaltendo gran parte del liquido di lavaggio. Le cellule positive al CD133 vengono rilasciate dalla colonna, rimuovendo la medesima dal campo magnetico ed eluendo le cellule in una sacca di raccolta cellulare. Conclusa la procedura le cellule ottenute vengono contate e caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica per valutarne il grado di purezza con anticorpo anti CD133 e anti CD34.

Nel nostro studio preclinico le cellule CD133 o CD34 isolate (Figura 1) sono state impiegate per studi "ex vivo":

1) Test di differenziazione cellulare endoteliale

Le cellule CD133 o CD34 isolate sono state posizionate su fibronectina e stratificate in fiasche da coltura tissutale 25-T, quindi lasciate crescere in mezzo M199 supplementato con 10% FBS, 50 ng/ml di vascular endothelial growth factor (VEGF), 1 ng/ml di basic-fibroblast growth factor (b-FGF) e 2 ng/ml di insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Quindi le cellule sono state coltivate a confluire per 3–4 settimane a 37°C in un'atmosfera pienamente umidificata al 5% di CO₂. Alla fine del periodo le colture sono state analizzate sia con citometria che con immunostochimica per valutare l'espressione di fattori di staminalità e di differenziazione endoteliale quali il VEGFR-1,-2, CD31 e VIII/vWF.

2) Test di clonogenità

La conferma della presenza di progenitori clonogenici ematopoietici è stata effettuata inseminando le cellule in duplicato nel mezzo di coltura MethoCult H4433, seguendo le istruzioni del produttore. Le colonie di granulociti-macrofagi (CFU-GM), le colonie di progenitori eritroidi (burst-forming unit-erythroid [BFU-E]), e le colonie miste (CFU-granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte [CFU-GEMM]) sono state contate dopo 14 giorni di incubazione a 37°C in un ambiente pienamente umidificato al 5% di CO₂. Il numero di long-term culture initiating cells (LTC-IC) è stato determinato dalle cellule purificate CD133 o CD34 stratificate su cellule stromali irradiate geneticamente costruite e prestabilite.

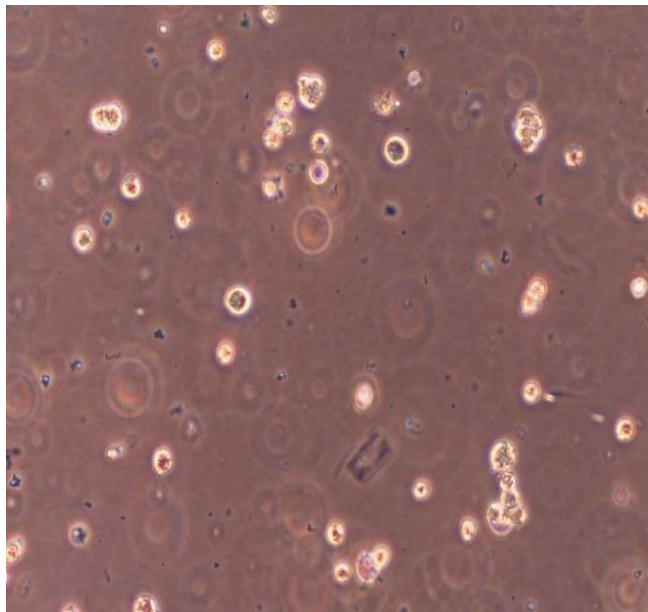


Fig. 1: microscopia ottica: CD133⁺ “selected” cells

b) Risultati

Le procedure di purificazione hanno consentito di ottenere un buon risultato in termini di purezza cellulare, vitalità e numero finale di cellule CD 133 isolate, in linea con altri dati riportati dalla letteratura scientifica (Tab. 3).

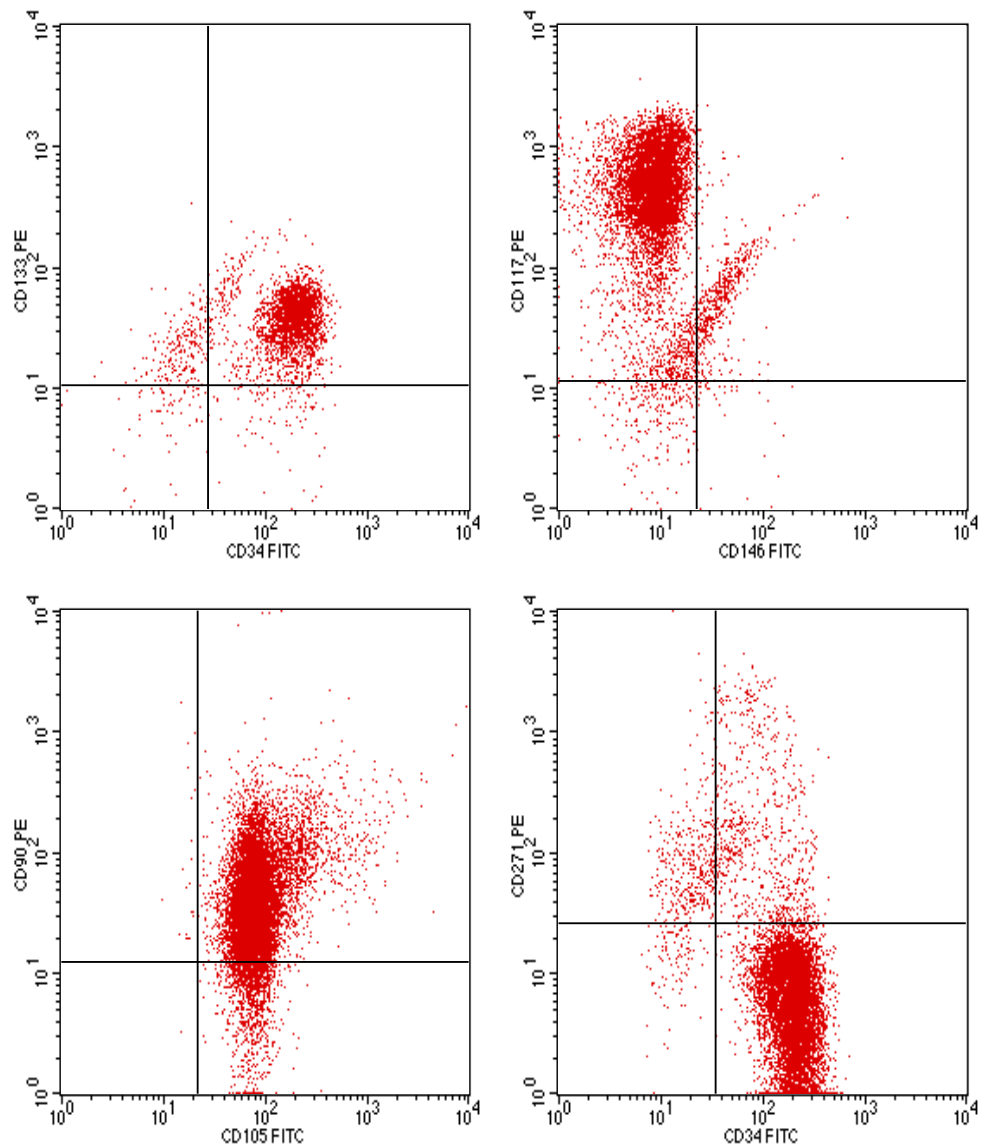
	Paziente n.1	Paziente n.2	Paziente n.3
Volume aspirato	98.3 ml	120 ml	82 ml
Cellule totali iniziali	1.2×10^9	2.3×10^9	720×10^6
CD133 iniziali stimate	6×10^6	10×10^6	2×10^6
CD 133 purificate	2×10^6	3×10^6	0.8×10^6
Purezza	85%	70%	50%
Recupero	30%	22%	20%
Vitalità	95%	95%	85%
CD133 disponibili	1.6×10^6	2×10^6	0.34×10^6

Tabella 3: Risultati purificazione, “recovery” e vitalità delle CD133 isolate mediante CliniMACS

L’analisi immunofenotipica eseguita sulle cellule prelevate dal midollo e purificate dal sistema CliniMACS ha mostrato una elevata percentuale di marcatori antigenici di tipo endoteliale come rappresentato nella figura 2.

In particolare le cellule presentavano nel 98% l'antigene CD 34+, nel 99% il CD 105+ (detto anche endogлина, antigene di superficie espresso dall'endotelio vascolare), e nel 95% il CD 117+ (detto anche c-KIT, recettore per citochine espresso sulla superficie delle cellule staminali ematopoietiche) ed il CD 90+.

Successivamente le cellule sono state poste in coltura per i tests di clonogenicità e di differenziazione endoteliale. In terreni di coltura non differenziati le CD 133+ hanno dimostrato di mantenere una buona autoreplicazione (Fig 3 A) e di esprimere antigeni di superficie di staminalità CD 34+ e di differenziazione in senso endoteliale CD 105+ endogлина. Inoltre poste in terreno di coltura con fattori di crescita specifici (VEGF ed FGF) tali cellule esprimono il marcatore di differenziamento endoteliale von Willebrand factor (vWF) ed il marcatore di differenziamento muscolare liscio Smooth Muscle Actin (SMA), come appare dalle immagini in immunofluorescenza della figura 3 B. Infine dopo tre settimane di crescita in terreno di coltura con fattori di crescita specifici, le cellule di due pazienti sono state sottoposte a reazione a catena delle polimerasi o PCR (polymerase chain reaction) per valutare l'espressione di mRNA di alcune proteine markers di superficie rispetto a cellule di controllo endoteliali di cordone ombelicale (HUVEC) (Fig. 4).



CD34 = 98%
 CD105 = 99%
 CD117 = 95%
 CD90 = 95%
 CD271 = 2%
 CD146 = 1%

Fig. 2: Analisi immunofenotipica delle cellule purificate con il sistema CliniMACS

Fig 3 A: Dopo 21 gg di colture con IMDM + 10% FBS + 1x ITS

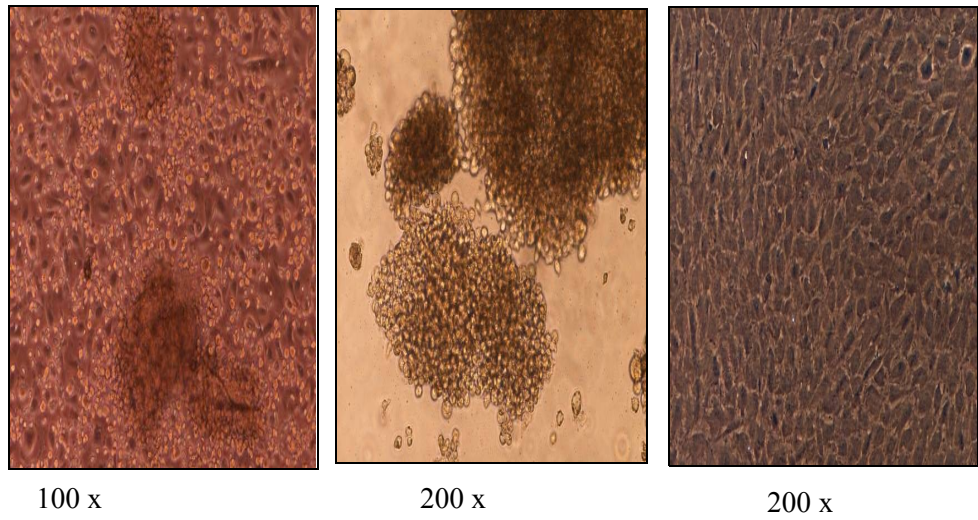
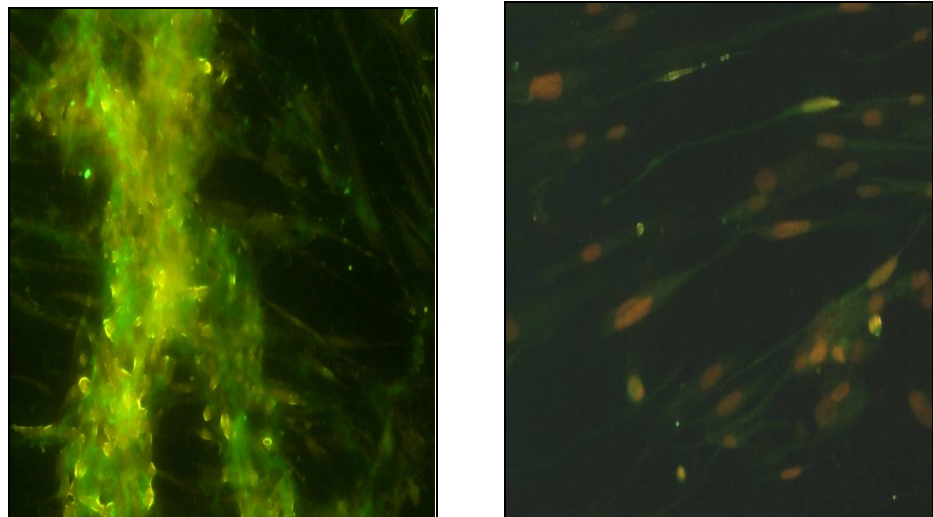


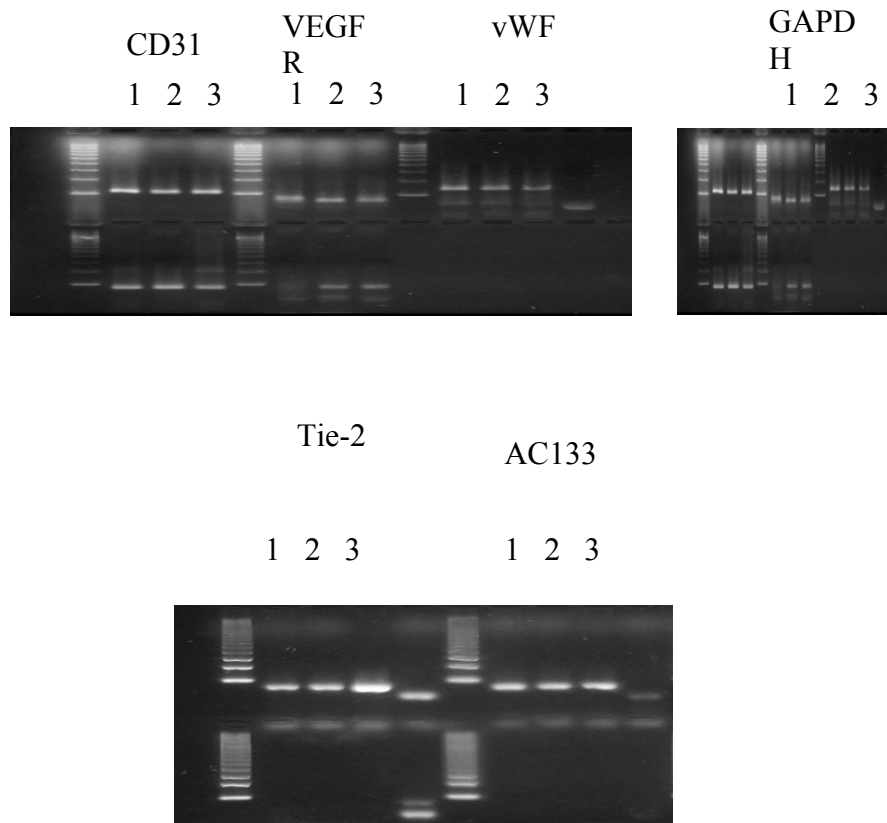
Fig. 3 B: Induzione per 21 gg in terreno con aggiunta di VEGF 50 ng/ml ed FGF2 10 ng/ml



vWF e PI

SMA e PI

Figura 3: Tests di clonogenicità e di differenziazione endoteliale



1 cellule CD 133+ dopo 21gg di condizionamento (caso 1)
 1 cellule CD 133+ dopo 21gg di condizionamento (caso 2)
 3 cellule HUVEC di controllo

Fig. 4: Polymerase chain reaction: markers di differenziazione endoteliale.

Tali cellule midollari poste in coltura esprimono sintesi proteica rispettivamente per: il CD 31+ ossia il PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1), glicoproteina espressa sulla superficie di monoliti, neutrofilo, piastrine e cellule T; il VEGFR (recettore per il vascular endothelial growth factor), espresso esclusivamente nelle cellule endoteliali; il fattore di von Willebrand, glicoproteina presente nel plasma e prodotta nell'endotelio; il Tie-2, recettore per l'angiopoietina (proteina fattore di crescita richiesto per la neoangiogenesi) oltre all'espressione del marker AC 133+.

c) Discussione e conclusioni

Nonostante le terapie mediche, interventistiche e chirurgiche, il trattamento dei pazienti con insufficienza cardiaca avanzata rimane una sfida sia per i clinici che per i biologi cellulari. La terapia di trapianto cellulare è emersa come un nuovo potenziale approccio negli ultimi anni. Gli studi sperimentali su animale e quelli clinici iniziali hanno dimostrato la fattibilità tecnica ed i potenziali benefici clinici di tale metodica. Dai risultati preclinici ottenuti nel nostro protocollo si evince che le cellule staminali derivate dal midollo osseo (progenitrici endoteliali) hanno buoni requisiti di sopravvivenza, di replicazione in vitro ed esprimono una differenziazione in senso endoteliale adatta all'impiego potenziale nella terapia cellulare rigenerativa dell'insufficienza cardiaca congestizia, soprattutto nella ipotesi terapeutica di neovascolarizzazione di aree con pregresso infarto o in territori che non sono suscettibili ad altre opzioni di rivascularizzazione tradizionale sia chirurgica che percutanea.

Rimangono aperti una serie di quesiti quali: il tipo ottimale di cellule per specifici pazienti, la quantità e la purezza ottimale delle cellule da somministrare, la scelta del miglior modo di somministrazione (intracoronarico, retrogrado via seno coronarico,

transendocardico o transepicardico), la scelta della metodica più affidabile per la valutazione del grado di engraftment, di sopravvivenza e di differenziazione cellulare, la valutazione della sicurezza delle terapie in termini di potenziale tumorigeno ed aritmogenico, la valutazione delle metodiche di mobilitazione farmacologica delle cellule con citochine ed i relativi effetti potenziali sistemici (eccesso proliferazione della neointima), l'effetto confondente delle terapie associate (CABG nelle stesse aree di inoculazione) e la potenziale associazione con l'impianto di sistemi di assistenza ventricolare come destination therapy.

Comunque, ulteriori ricerche, in particolare trias clinici controllati, sono necessarie per esplorare ancora i meccanismi terapeutici del trapianto cellulare accettando nel contempo la possibilità che potenziali effetti collaterali possano accadere. Con riferimento alla pratica clinica, i problemi etici ed il pericolo dell'immunogenicità associati all'uso delle cellule embrionali dovranno essere considerate. La prossima decade vedrà i risultati dei trial clinici effettuati con lo scopo di testare l'efficacia delle cellule staminali nella rigenerazione dei tessuti cardiaci danneggiati, ma , nel frattempo la terapia di trapianto cellulare continua a rappresentare un approccio affascinante nel trattamento dell'insufficienza cardiaca e della malattia ischemica per il prossimo futuro.

BIBLIOGRAFIA

1. Lange R, et al. Performance of allografts and xenografts for right ventricular outflow tract reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: S365-S367.
2. Langer R, et al. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-6.
3. Gheorghiade M, et al. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. *Circulation* 1998; 97: 282-289.

4. Geng YJ. Molecular mechanism for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 687-697.
5. Nadal-Ginard B, et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92: 139-150.
6. Forrester JS, et al. Stem cell repair of infarcted myocardium, an overview for clinicians. *Circulation* 2003; 108: 1139-1145.
7. Zimmermann WH, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 2002; 106: I151-I157.
8. Vats A, et al. Stem cells. *Lancet* 2005 ; 366 : 592-602.
9. Tsai RY, et al. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2002; 2: 707-712.
10. Dinsmore J, et al. Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 1996; 5: 131-143.
11. Kehat I, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-414.
12. Thomson JA, et al. Embryonic Stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
13. Pittenger MF, et al. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95: 9-20.
14. Angelis D, et al. Skeletal myogenic progenitors originate from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to post-natal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999; 147: 869-877.

15. Murry CE, et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-2523.
16. Hagege AA, et al. Regeneration of the myocardium : a new role in the treatment of ischemic heart disease? *Hypertension* 2001; 38: 1413-1415.
17. Siminiak T, et al. Myocardial replacement therapy. *Circulation* 2003; 108: 1167-1171.
18. Taylor DA. Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2001; 2: 208-210.
19. Suzuki K, et al. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation* 2001; 104(Suppl. I): I107-112.
20. Menasché P, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-280.
21. Menasché P, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-1083.
22. Herreros J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 2012-2020.
23. Pagani FD, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 879-888.
24. Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 1-22.

25. Young HE, et al. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 753-769.
26. Eglitis MA, et al. Hematopoietic cells differentiated into both microglia and macroglia in the brain of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4080-4085.
27. Tomita S, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(Suppl II): 247-256.
28. Condorelli G, et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10733-10738.
29. Yeh ETH, et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003; 108: 2070-2073.
30. Murry CE, et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668.
31. Krause DS, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 369-377.
32. Orlic D, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
33. Orlic D, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-10349.
34. Jackson KA, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395-1402.
35. Pittenger MF, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

36. Azizi SA, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats- similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908-3913.
37. Makino S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
38. Pereira RF, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857-4861.
39. Gehling UM, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC 133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-3112.
40. Peichev M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958.
41. Shi Q, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. 1998; 92: 362-367.
42. Quaini F, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.
43. Schwartz RS, et al. Can the heart repair itself? *N Engl J Med* 2002; 346: 2-4.
44. Fazel S, et al. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1865-1877.
45. Wang Y, et al. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 40: 736-745.

46. Mouquet F et al. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res* 2005; 97: 1090-1092.
47. Kawamoto A, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637.
48. Toma C, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98.
49. Hocht-Zeisberg E, et al. Cellular repopulation of myocardial infarction in patients with sex-mismatched heart transplantation. *Eur Heart J* 2004; 25: 749-758.
50. Leone AM, et al. Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006; 111: 202-208.
51. Wang Y, et al. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention *Heart* 2006; 92: 768-774.
52. Askari AT, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362: 697-703.
53. Heeschen C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-1346.
54. Llevadot J, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399-405.
55. Norol F, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003; 102: 4361-4368.

56. Balsam LB, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668-673.
57. Limbourg FP, et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 722-729.
58. Davani S, et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003; 108 (Suppl I): II253-II258.
59. Terada N, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545.
60. Vassilopoulos G, et al. Cell fusion: an alternative to stem cells plasticity and its therapeutic implications. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13: 480-485.
61. Asahara T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228.
62. Urbich C, et al. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108: 2511-2516.
63. Camargo FD, et al. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 2003; 9: 1520-1527.
64. Uemura R, et al. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodelling of ischemic heart through paracrine signalling. *Circ Res* 2006; 98: 1414-1421.
65. Kocher AA, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-436.

66. Fuchs S, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1726-1732.
67. Kinnaird T, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94: 678-685.
68. Fuchs JR, et al. Tissue engineering: a 21th century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 577-91.
69. Kadner A, et al. A new source for cardiovascular tissue engineering: human bone marrow stromal cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; 21: 1055-1060.
70. Hoerstrup SP, et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 2002; 106: I143-150.
71. Stock UA, et al. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 732-740.
72. Hoerstrup SP, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro.. *Circulation* 2000; 102: III 44-III49.
73. Sutherland FWH, et al. From cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation* 2005; 111: 2783:2791.
74. Niklason LE, et al. Functional arteries grown in vitro. *Science* 1999; 284: 489-493.
75. Shin'oka T, et al. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 2001; 344: 532-3.
76. Hoerstrup SP, et al. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg* 2002;74: 46-52.

77. Li RK, et al. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 368-375.
78. Tomita S, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1132-1140.
79. Zimmermann WH, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002; 90: 223-230.
80. Leor J, et al. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; 102: III56-III61.
81. Miyagawa S, et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 2002; 105: 2556-2561.
82. Wollert KC, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-148.
83. Meyer GP, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113: 1287-1294.
84. Lunde K, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199- 1209.
85. Schachinger V, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210-1221.
86. Ince H, et al. Prevention of left ventricular remodelling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the

Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005; 112: I73-I80.

87. Ripa S, et al. Stem Cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* 2006; 113: 1983-1992.
88. Zohnhofer D, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1003-1010.

