



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA

"TOR VERGATA"

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE

XXI ciclo

“Terapia cellulare e ingegneria tissutale nelle patologie ischemiche del miocardio: creazione di un miocardio artificiale per la rigenerazione cardiaca.”

MARIANGELA PERUZZI

A.A. 2008/2009

Docente guida/Tutor:
Prof. Giacomo Frati
Romeo

Coordinatore:
Prof. Francesco

INDICE

	Pag.
1 - Introduzione - Considerazioni generali	4
2 - Medicina traslazionale: contesto scientifico della ricerca	16
3 - Piano sperimentale, metodologia generale	24
4 - Modello sperimentale animale	25
5 - Isolamento, espansione, differenziazione ed organizzazione di cellule staminali cardiache in una matrice bioingegnerizzata	33
6 - Preparazione della Matrice di Collagene	35
7 - Valutazione funzionale dei risultati, metodologia, criteri	38
8 - Risultati	46
9 - Discussione	49
10 - Bibliografia	52
11-Ringraziamenti	59



“ E così Prometeo, dai mille espedienti, fu imprigionato da Zeus tramite indissolubili vincoli e dolorosi legami e poi legato a metà di una colonna e sopra Zeus fece in modo che gli si avventasse un’aquila, dalle ampie ali e che questa gli divorasse il fegato immortale, il quale, di notte, ricresceva di tanto quanto di giorno ne aveva mangiato il rapace dalle ampie ali”

(Esiodo. La Teogonia VIII-VII sec a.C)

Introduzione - Considerazioni generali

Giulio Bizzozzero¹ mise in evidenza nel 1868 che eritropoiesi/leucopoiesi avvengono nel midollo osseo con un continuo rinnovamento: da questa osservazione deriva la sua classificazione dei tessuti in labili, stabili e perenni. Alexis Carrel², un noto chirurgo francese, dimostrò, nei primi anni del '900, come fosse possibile coltivare *in vitro* espianti di organi e tessuti. La combinazione di questi dati ha fatto presagire la possibilità di isolare cellule progenitrici, espanderle *in vitro*³ ed utilizzarle successivamente per terapie sostitutive, possibilità che si è da tempo concretizzata ad esempio nel trapianto di midollo osseo (ad esempio nel caso di terapie fortemente citotossiche in pazienti leucemici o in casi di pan-irradiazione) **[Fig.1]**.

In questi ultimi anni poi, la prospettiva di poter utilizzare terapie cellulari sostitutive di lesioni acute o croniche di organi e tessuti non rinnovabili, sta incontrando un interesse sempre maggiore. Le malattie suscettibili di cura vengono ipotizzate in relazione a perdita di cellule terminalmente differenziate per sopraggiunta necrosi oppure in relazione a perdita di funzione: malattie genetiche, ma anche malattie acquisite, come diabete, malattia di Parkinson, sclerosi multipla, usura di cartilagini, perdita di sostanza ossea ed infine infarto del miocardio, sono le condizioni patologiche che costituiscono gli ipotetici "target terapeutici"⁴ di maggior interesse, mentre come sorgenti di cellule⁵ sono indicati il sangue da cordone ombelicale, tessuti embrionali, cellule staminali da midollo osseo, cellule derivate dagli adipociti, cellule staminali adulte, cellule ottenute da ibridazione somatica con zigoti (*nuclear transfer*) ed infine più di recente, cellule staminali pluripotenti indotte (iPS cells). **Bibliografia**

The Promise of Stem Cell Research

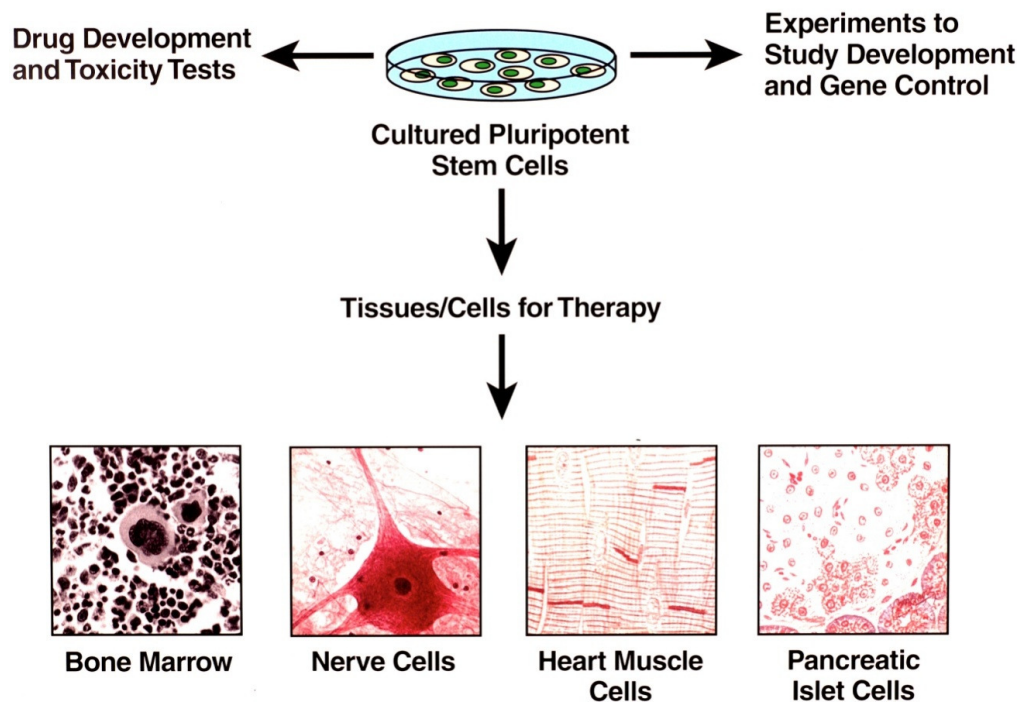


Figura 1

I dati sperimentali e le prospettive di applicazioni clinica hanno dato luogo a riviste di settore [*Stem Cells, Cloning Stem Cells, Current Stem Cells Therapy*], così come alla diffusione dei risultati su riviste generali a larga diffusione internazionale [*Nature, Nature Medicine, Science, Proc. Natl Acad Sci USA, New England J Medicine, Circulation, Circulation Res.*] Dati preliminari e le conseguenti prospettive portano ad ipotizzare la possibilità di introdurre la terapia cellulare come importante mezzo terapeutico del prossimo futuro e ad istituire banche di cellule staminali [UK, 2004]. Sono già attive, in questo senso, banche pubbliche o private, nei paesi membri della Comunità Europea e non. Ciò in perfetto accordo con la legislazione vigente nei rispettivi paesi. Di recente insorgenza e di notevole interesse è il dibattito concernente la possibilità di conservazione autologa (per uso intra-familiare nello specifico caso)

delle cellule staminali di derivazione cordonale. Proprio in funzione di questi motivi, si presagisce la figura di un ricercatore clinico specializzato nella “riparazione cellulare”: un Prometeo⁶ dei tempi moderni, che utilizza cellule staminali, isolandole, inducendone il *commitment* verso tessuti adulti specializzati avvalendosi della tecnologia della ibridazione somatica/*nuclear transfer*, per recuperare funzionalità d’organo perdute o compromesse. E d’altra parte proprio l’idea di un tessuto continuamente rigenerante ipotizza l’esistenza di una situazione simile a quella che nel mito è rappresentata dall’avvoltoio di Prometeo che si alimenta del fegato rigenerante dell’eroe³.

Convenzionalmente si distinguono cellule *totipotenti* (*totipotency*: cellule che possono formare sia embrioni che tessuti extra-embryonali) da cellule *multipotenti* (*pluripotency*: cellule capaci di svilupparsi da uno stadio embriologico più avanzato verso tessuti specializzati; *three germ-layers: ectoderm, endoderm, mesoderm*)⁷⁻⁸[Fig.2].

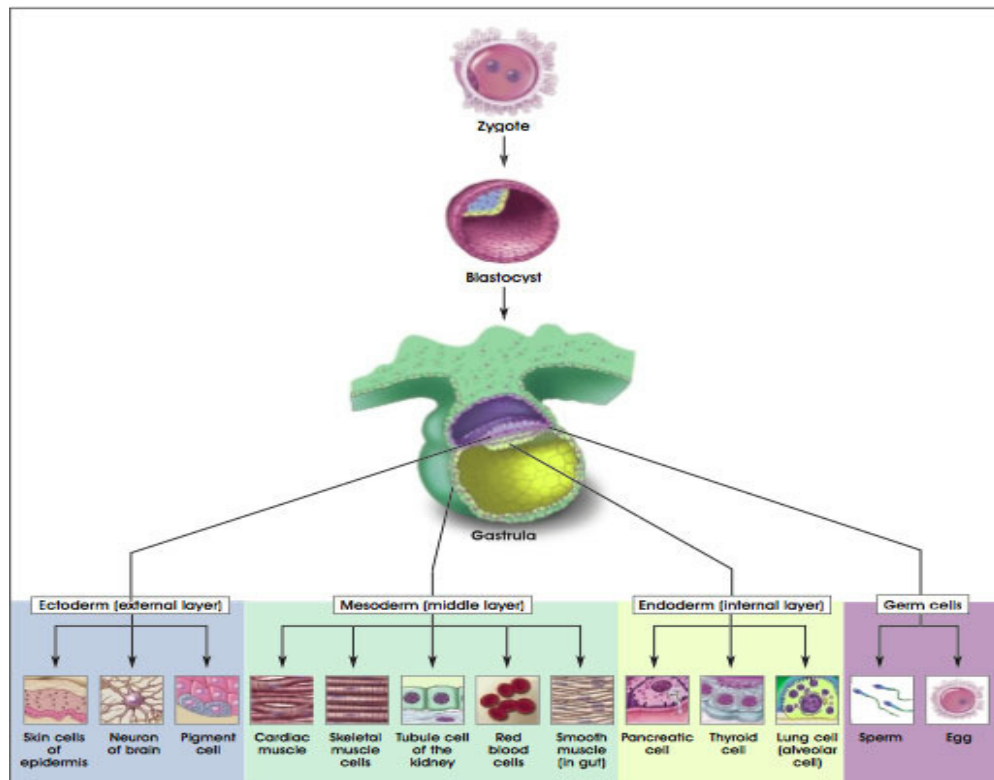


Figura 2

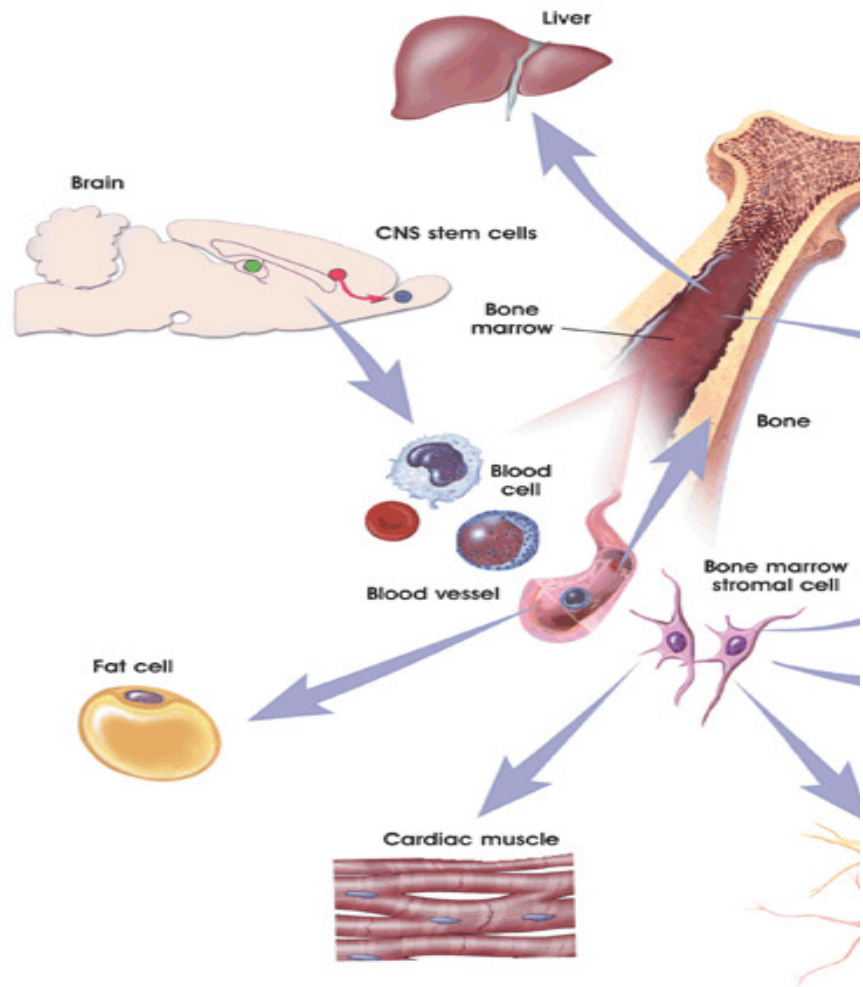
Cellule umane multipotenti disponibili includono: *embryonic germ cells* [EG], *embryonic carcinoma cells* [EC], *embryonic stem cells* isolate da blastocisti [ES]⁴.

L'utilizzazione di cellule embrionali ha suscitato un ampio dibattito, con alcune Nazioni maggiormente permissive⁹, tra cui gli USA, che hanno reso disponibili - tramite una banca di cellule del National Institutes of Health - linee cellulari staminali ottenute da blastocisti umane. Appare opportuno ricordare come il neo presidente eletto degli USA Barack Obama abbia di recente firmato un ordine esecutivo in cui sono stati rimossi i limiti/vincoli (imposti nel 2001 dall'allora presidente G.W.Bush) al finanziamento pubblico concernente la ricerca sulle cellule staminali embrionali (ordine limitato alla ricerca riguardante malattie definite "gravi" come la sclerosi multipla). Ugualmente permissivi sono UK e Singapore, definiti come paesi ad alto tasso di sviluppo in questo settore in una recente lettera editoriale di Nature

Biotechnology¹⁰. Altri Paesi permettono sperimentazioni su cellule staminali embrionali di embrioni soprannumerari già esistenti, come Australia, Belgio, Danimarca, Finlandia, Francia, Grecia, Svezia, mentre alcuni Paesi hanno adottato moratorie o leggi che proibiscono l'utilizzazione di embrioni anche soprannumerari. Una recente rassegna delle opinioni espresse da Comitati Etici Nazionali dell'Unione Europea è stata pubblicata dal Direttorato per la Ricerca della Commissione Europea. Anche da queste considerazioni etiche emerge l'interesse a rivolgere l'attenzione verso altre sorgenti di cellule staminali, tra cui il midollo osseo, le cellule staminali di derivazione cordonale ed i tessuti adulti differenziati.

Più di recente è stata infatti descritta la presenza di cellule *multipotenti staminali* in tessuti adulti¹¹, sia nel midollo osseo, che in altri tessuti (cuore, orecchio interno, sistema nervoso, bulbo pilifero, polpa dentaria, etc;).

Per quanto riguarda il midollo osseo, di particolare interesse è la dimostrazione della possibile migrazione/trans-differenziamento di cellule staminali *committed*, dimostrata non solo per cellule midollari verso una larga varietà di tessuti, ma anche da tessuti a maggiore differenziazione [fig. 3]. A dati preliminari che dimostravano un transdifferenziamento fenotipico è poi seguita una più attenta analisi molecolare che ha dimostrato la permanenza del fenotipo-*commitment* originale: tale è il caso del tessuto muscolare scheletrico [che rimane *committed* verso il fenotipo muscolare scheletrico anche dopo iniezione in tessuto cardiaco]¹².



© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall

Una migrazione cellulare non da midollo osseo è comunque dimostrata: si veda a tal proposito l'esperimento del gruppo di Piero Anversa¹³, che ha dimostrato l'esistenza

di cellule maschili in biopsie di cuore espantato e poi trapiantato [chimerismo cellulare in cuori trapiantati da maschio a femmina e viceversa;].

A questo punto c'è da premettere che per lungo tempo il cuore è stato considerato un organo post-mitotico, incapace di rigenerare le proprie cellule. Secondo questo paradigma, ampiamente accettato, ma mai definitivamente dimostrato, il numero di cellule cardiache sarebbe ben definito e costante sin dalla nascita e il turnover delle proteine contrattili sarebbe sufficiente per assicurarne la funzionalità. Da questo ne consegue che i cardiomiociti dovrebbero essere praticamente immortali, andando incontro ad una morte "programmata" (per apoptosi)¹⁴ o, alternativamente, solo in presenza di una patologia (come l'infarto miocardico). L'unica possibile risposta alla perdita cellulare conseguente ad un insulto sarebbe l'ipertrofia compensatoria delle cellule residue. Numerosi studi sono stati fatti per capire i meccanismi molecolari che sarebbero alla base dell'ipertrofia, negando la possibilità di rigenerazione del tessuto cardiaco.

Questa teoria si è basata su diverse osservazioni:

- I. non è stato possibile identificare un mezzo di coltura in grado di sostenere la replicazione di miociti adulti: ne consegue l'impossibilità di ottenere delle linee cellulari continue di cellule differenziate;
- II. non è stato possibile identificare cellule in fase di replicazione, osservando sezioni di tessuto al microscopio ottico;
- III. tentativi di indurre la proliferazione di cardiomiociti adulti attraverso alterazioni dei meccanismi molecolari di controllo del ciclo cellulare, non hanno avuto successo;
- IV. la bassa frequenza di rhabdomyosarcomi e altri tumori nel cuore adulto;
- V. l'incapacità da parte del tessuto cardiaco di rigenerarsi in seguito ad un infarto. In realtà il risultato di un infarto è lo stesso in ogni organo, indipendentemente dal fatto

che le cellule parenchimali siano in grado di proliferare o meno, compresi il rene, il cervello, l'intestino e la cute.

Di fatto, recentemente, sono emerse evidenze che dimostrano una certa capacità rigenerativa¹⁵ del tessuto miocardico. L'utilizzo del microscopio confocale ad alta risoluzione, per esempio, ha consentito di identificare cellule in fase di replicazione, nel miocardio di diverse specie di mammiferi, in condizioni fisiologiche, ma soprattutto in condizioni patologiche¹⁶. Analisi morfometriche dimostrano che il numero di cellule aumenta durante la fase di crescita sia nell'uomo che nei roditori. L'esistenza di cellule in fase di replicazione è stata inoltre dimostrata da esperimenti di marcatura con timidina triziata, BrdU, e attraverso l'identificazione di marcatori del ciclo cellulare come PCNA (cofattore della DNA polimerasi δ), Ki67 (fattore presente nelle parte fibrillare del nucleolo, coinvolto nella sintesi di ribosomi). Inoltre è stato osservato, in seguito ad infarto, un aumento dell'espressione di geni correlati alla crescita, di cicline e chinasi ciclina dipendenti e dell'attività telomerasica¹⁷.

Queste osservazioni, hanno portato ad interrogarsi sulla possibile origine di questi cardiomiociti capaci di replicare e sul loro notevole aumento in risposta ad un improvviso sovraccarico di lavoro. Potrebbe trattarsi di una popolazione di cellule staminali / progenitrici residenti nel cuore di mammifero, o reclutate da siti extracardiaci, in risposta a particolari segnali.

Studi recenti hanno evidenziato che il cuore presenta una riserva di piccole cellule esprimenti markers di staminalità ($lin^- c-kit^+ Sca-1^+, MDR-1^+$)¹⁸ e dotate di attività telomerasica, tipica delle cellule capaci di replicazione. La rilevanza di queste cellule staminali cardiache in vivo è sottolineata dal fatto che il loro numero aumenta di circa 13 volte nel miocardio ipertrofico di pazienti con stenosi valvolare aortica. Markers di staminalità sono stati osservati sulla superficie di cellule in diversi stadi di

differenziamento, come dimostrato dalla co-espressione di marcatori cardiaci precoci o tardivi. Questo suggerisce che le cellule staminali cardiache (CSCs) residenti sono indirizzate verso un percorso differenziativo che porterà alla formazione di cardioblasti e successivamente di cardiomiociti. Cellule staminali cardiache caratterizzate da un basso tasso di replicazione, danno origine a progenitori “lineage ristretti” altamente proliferanti che diventeranno precursori committed verso il differenziamento cardiaco e infine raggiungeranno l’arresto della crescita e il differenziamento terminale.

L’identificazione di tali cellule spiega l’osservazione di eventi mitotici interspersi nel miocardio adulto, la cui frequenza aumenta drammaticamente in risposta da uno stress (es. insufficienza cardiaca, sovraccarico pressorio). Questi eventi mitotici molto probabilmente, sono associati alla replicazione e al differenziamento di CSCs adulte, piuttosto che alla divisione cellulare di cardiomiociti differenziati. Proprio in questo contesto, di sicuro interesse è il rilievo recente sulla possibilità di isolare cellule staminali da aree contigue o annesse al tessuto di ipotetico riutilizzo: sono state infatti isolate cellule staminali cardiache adulte da biopsie di aree sane e peri-infartuali (uomo, maiale, topo). Il gruppo di ricerca a cui afferisco, ha descritto per la prima volta cinque anni fa, un metodo per isolare ed espandere cellule staminali cardiache adulte (CSCs/CPCs) da biopsie miocardiche umane o da cuori murini e suini¹⁹. Questo metodo, utilizzato in seguito anche da altri autori per l’isolamento e l’espansione di cellule staminali da biopsie muscolari scheletriche e dalle auricole atriali, ha determinato un importante avanzamento nel campo della terapia cellulare in generale e, specificamente, nella rigenerazione cardiaca. Infatti, per la prima volta, la fonte delle cellule staminali da usare a scopo terapeutico risulta costituita proprio da biopsie ottenute dal tessuto stesso da rigenerare. Si offre quindi, la prospettiva di una

terapia cellulare autologa, effettuata con cellule staminali cardiache, con tutti i possibili vantaggi che tale approccio terapeutico può comportare. Tali cellule sono state espanse *in vitro* mediante coltura con fattori di crescita (EGF/Epidermal Growth Factor, bFGF/b-Fibroblastic Growth Factor, CT-1/cardiotrophin-1) e trombina, sino a formare cardiosfere [fig. 4] che mostrano capacità contrattile autonoma e spontanea²⁰.

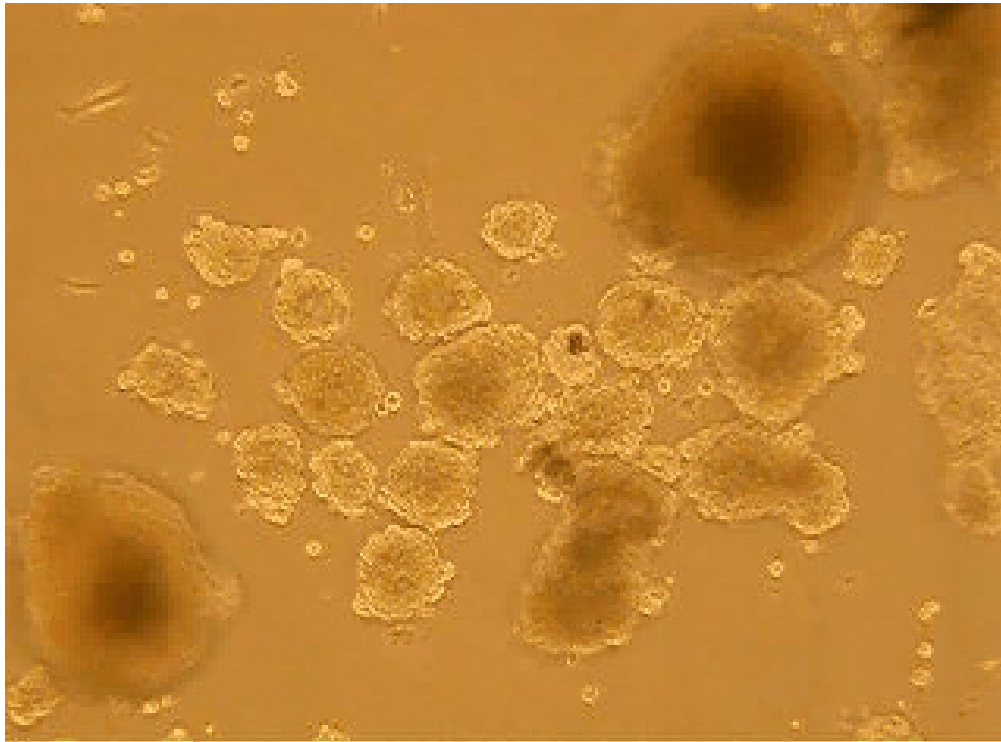


Figura.4 – Cardiosfere

Di cruciale importanza infine è la fase di trans-differenziamento indotta da fattori di crescita, tra i quali hanno particolare rilievo nell'induzione di trans-differenziamento²¹ verso cellule cardiache il granulocyte-colony stimulating factor/G-CSF (già granulocytosis inducing factor), l'SDF-1 (stromal derived factor-1) oltre ad EGF/Epidermal Growth Factor, b-FGF/Fibroblastic Growth Factor, BMP-2/bone morphogenetic protein, etc.

A questi dati di grande interesse ha fatto riscontro una positiva cautela nella generalizzazione dei risultati, non solo per problemi di riproducibilità standardizzata dei risultati stessi, ma soprattutto perché alcuni dati sono stati confermati solo per frazioni cellulari (5-10% delle cellule reimpiantate o migrate inizialmente). Ciò pone tre possibili spiegazioni: a) le condizioni di reimpianto (ad es. in zone necrotiche o perinecrotiche) scontano una scarsa vascolarizzazione territoriale; b) le cellule staminali circolanti hanno un *commitment* specializzato non stabile anche quando raggiungono il tessuto target (fenotipo che transdifferenzia da miocardiociti a fibroblasti per esempio); c) le metodologie/tecniche di *delivery* cellulare non sempre garantiscono elevate percentuali di ritenzione ed engraftment all'interno del tessuto da trattare.

Si è, infatti, forse troppo affrettatamente ritenuto, dopo i primi risultati del gruppo di Orlic e Anversa²², che le cellule staminali midollari circolino normalmente nel sangue, localizzandosi nei rispettivi tessuti target (*homing ability*), ripopolandoli e rigenerando i tessuti. La prova per la ripopolazione adottata da Orlic e Anversa consiste nell'aver ritrovato nelle supposte cellule cardiache derivate da bone marrow specifici markers proteici cardiaci, analizzati tramite immunofluorescenza, mentre in studi più recenti il fenotipo delle cellule ripopolanti è risultato di tipo fibroblastico, dati questi derivati da esperimenti di Murry et al.²³ e di Balsam et al.²⁴, che hanno utilizzato markers genetici. Questi autori non hanno trovato una così consistente ripopolazione cellulare da midollo osseo, né un così consistente miglioramento dei parametri funzionali cardiaci dopo ripopolazione, come era stato riportato da Orlic, Anversa et al. e da Kocher et al.²⁵. Commentando i lavori originali di Orlic et al. e poi i diversi risultati ottenuti dai gruppi di Murry e di Balsam, Kenneth R. Chien²⁶ ricorda

che alcuni fenomeni di replicazione cellulare sono dovuti a “*cell fusion*”, evento descritto per cellule cardiache, epatiche e nervose.

Nel suo editoriale sulla rivista *Nature*, Chien mette in evidenza come sia necessario procedere a controlli rigorosi, perché fondato è il sospetto che non si sia ancora trovata una metodologia ripetibile per utilizzare cellule staminali midollari²⁷, cosicché sono indicate sette condizioni per passare dai dati sperimentali alla terapia [Tabella 1].

1 Demonstration that the progenitor/stem cell of interest can differentiate <i>in vitro</i> into fully mature cardiac muscle cells in the absence of cell fusion.
2 Documentation that the cell type can function as an authentic <i>in vivo</i> cardiac progenitor in the embryonic or postnatal heart, and can be localized to a specific region of the intact heart.
3 Identification of specific, defined molecular cues that drive the differentiation of the progenitor/stem cells into physiologically functioning cardiac muscle cells.
4 Use of genetic markers to identify cells within an intact organ/tissue; re-isolation of these cells, and documentation of differentiation (molecular and physiological) that is indistinguishable from differentiated cells from the same preparation.
5 Improvement in organ/tissue function clearly ascribed to differentiation of the cell type of interest.
6 Documentation of stability, electrical coupling and lack of long-term loss of specialization or transformation events.
7 Direct demonstration that results in genetically modified mice can be extrapolated to large-animal models of heart failure that better reflect human cardiac physiology.

Figure 2 From experiment to therapy. A stepwise translational pathway for systematically moving experimental studies of cardiac stem cells into potential clinical therapy for heart failure.

Tabella 1

[Kenneth R. Chien, *Lost in translation*. *Nature* 2004;428:607-608]

La ricerca non ha dunque ancora offerto indicazioni univoche di efficacia clinica nella combinazione tra malattia, sorgente cellulare, metodologia di espansione, tecniche di delivery, ripopolazione, condizioni di vascolarizzazione e di stabilità del *commitment* specifico, efficacia nel correggere parametri funzionali. E d'altra parte ricerche che sono inizialmente apparse promettenti si sono successivamente rivelate come fenomeni parziali, seppure importanti: tale è il caso, come detto, dei dati sulla capacità di migrazione cellulare da un organo o tessuto verso altro organo di cellule staminali o almeno di cellule progenitrici provenienti da altro organo o tessuto²⁸. Si è dimostrato che questa capacità di migrazione interessa una percentuale molto bassa di cellule non sufficiente a garantire un adeguato ripristino della funzionalità perduta né tantomeno compromessa, e che altri fenomeni attribuiti alla capacità proliferante di cellule staminali sono in realtà da attribuire a fusioni cellulari tra cellule migrate e cellule dell'organo target.

In virtù di queste premesse anche i primi trials clinici condotti sull'uomo mediante l'utilizzo di cellule staminali derivate da midollo osseo, hanno reso evidente, da un lato il buon grado di sicurezza raggiunto dalle procedure di impianto, dall'altro che i risultati clinici espressi in termini di recupero della frazione di eiezione non sono ancora giudicabili come pienamente soddisfacenti con benefici che variano dall'essere del tutto assenti a transitori, o comunque, in molti casi, marginali.

A tal proposito di notevole interesse è l'articolo edito sul numero di settembre 2006 del *New England Journal of Medicine*²⁹, dove vengono messi a confronto i risultati dei principali trials clinici condotti sull'uomo mediante l'utilizzo di BMC (**Tabella 2**).

Table 1. Randomized, Controlled Trials of BMC for Cardiac Disease.*

Trial or Investigator Group	Setting	Design	No. of Cells Administered in Treatment Group	Results
BOOST ^{4,9}	PCI after acute myocardial infarction	Randomized trial 30 patients received BMC; 30 received no infusion LVEF assessed by MRI	Approximately 2.5×10^9 unfractionated BMC	At 6 mo: LVEF 6% greater in BMC group than in control group At 18 mo: no significant difference in LVEF between the 2 groups
Janssens et al. ⁸	PCI after acute myocardial infarction	Randomized, double-blind trial 33 patients received BMC; 34 received placebo infusion LVEF was assessed by MRI	Approximately 3×10^8 Ficoll-separated BMC	At 4 mo: no significant difference in overall LVEF; decreased infarct size and better regional function in BMC group
TOPCARE-CHD ⁶	Chronic left ventricular dysfunction	Randomized, crossover trial In the second phase, 24 patients received CPC, 28 received BMC, 23 received no infusion LVEF assessed by left ventricular angiography	Approximately 2×10^8 Ficoll-separated BMC or approximately 2×10^7 Ficoll-separated, cultured CPC	At 3 mo: greater increase in LVEF (2.9 percentage points) in BMC group than in CPC group or control group
ASTAMI ⁷	PCI after acute myocardial infarction	Randomized trial 47 patients received BMC; 50 received no infusion LVEF assessed by SPECT, echocardiography, and MRI	Approximately 7×10^7 Ficoll-separated BMC	At 6 mo: no significant difference in LVEF between the 2 groups
REPAIR-AMI ⁵	PCI after acute myocardial infarction	Randomized, double-blind trial 101 patients received BMC; 98 received placebo infusion LVEF assessed by left ventricular angiography	Approximately 2.4×10^8 Ficoll-separated BMC	At 4 mo: greater absolute increase in LVEF in BMC group than in placebo group (5.5% vs. 3.0%) At 1 yr: reduction in combined adverse clinical events in BMC group as compared with placebo group

* BOOST denotes Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration, PCI percutaneous coronary intervention, MRI magnetic resonance imaging, TOPCARE-CHD Transplantation of Progenitor Cells and Recovery of LV Function in Patients with Chronic Ischemic Heart Disease, CPC progenitor cells derived from circulating blood, ASTAMI Autologous Stem-Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction, SPECT single-photon-emission computed tomography, and REPAIR-AMI Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction.

Tabella 2- (Trials clinici condotti sull'uomo mediante BMC.)

Medicina traslazionale: contesto scientifico della ricerca

Con 450.000/500.000 nuovi casi l'anno negli Stati Uniti e circa 100.000 in Italia, l'insufficienza cardiaca è un problema medico/sociale sempre più attuale³⁰. La patologia cardiovascolare rimane infatti, una delle principali cause di morbilità/mortalità nel mondo occidentale. Circa il 2% del budget sanitario dei paesi industrializzati viene utilizzato per le cure medico-chirurgiche del caso ed in considerazione del progressivo aumento dell'età media della popolazione esso è sicuramente destinato ad aumentare³¹.

Nonostante gli importanti progressi medico-chirurgici degli ultimi anni, persistono ancora delle forme gravi, refrattarie ai trattamenti convenzionali, che appaiono tali da giustificare opzioni terapeutiche "alternative". Ed è proprio in questo contesto che si colloca potenzialmente il concetto di terapia cellulare³².

Allo stato attuale, la validità del concetto sul quale è fondata (rigenerazione di una parte di miocardio necrotica, utilizzando cellule viventi ed anatomicamente funzionali) è stata stabilita con delle popolazioni cellulari differenti (cardiomiociti fetali, mioblasti scheletrici, cellule del midollo, cellule mesenchimali, cellule di derivazione cordonale, cellule staminali embrionali) in animali di piccola e grande taglia.

Svariati trials clinici sono stati condotti anche sull'uomo anche con mioblasti scheletrici e cellule del midollo osseo con risultati in parte controversi³³.

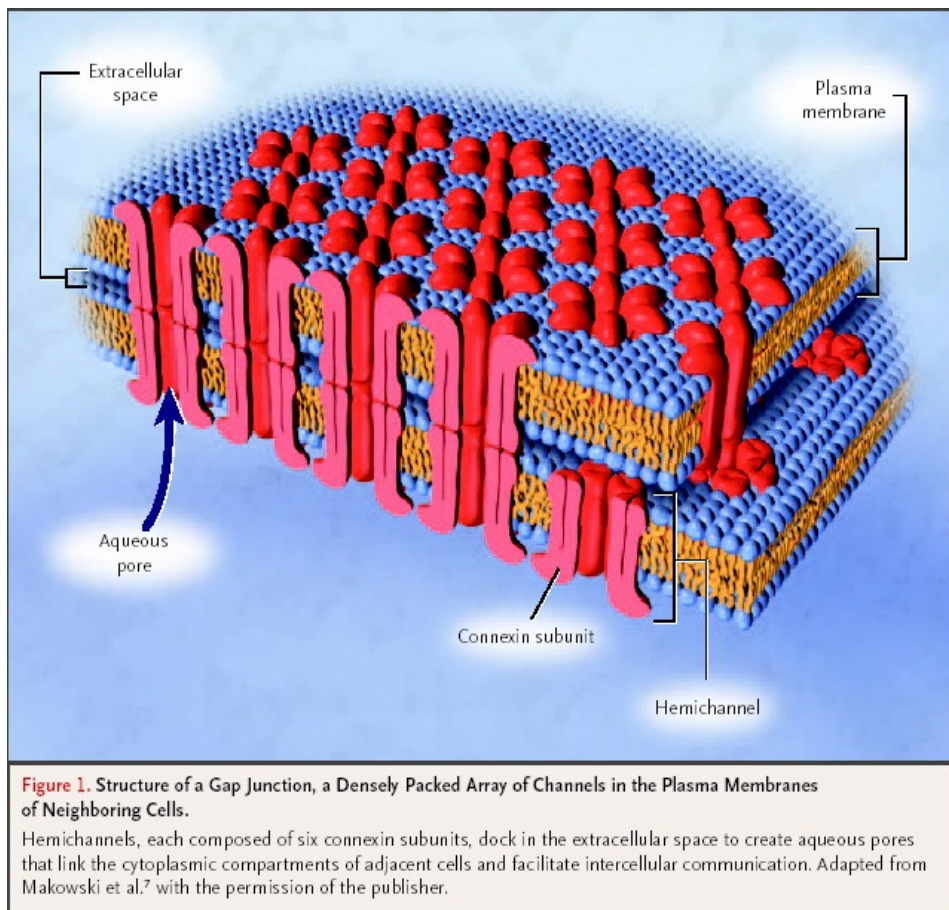
Infatti, sebbene i meccanismi del miglioramento funzionale cardiaco rapportato al trapianto cellulare non siano stati del tutto compresi (effetti autocrini, paracrini oltre che propriamente funzionali), i risultati incoraggianti di molti lavori hanno aperto la strada alle prime prove cliniche nel contesto della cardiomiopatia ischemica severa e

refrattaria ai trattamenti “convenzionali” (MAGIC, BOOST, TOPCARE-CHD, REPAIR-AMI, ASTAMI, MAGNUM)³⁴.

Nonostante risultati descritti come concretamente promettenti, alcuni commenti comparativi hanno evidenziato, come già accennato nell’introduzione, problemi metodologici fondamentali, che devono essere ancora risolti.

L’utilizzo di elementi cellulari come i mioblasti scheletrici per esempio si è dimostrato essere fortemente limitato dall’elevata incidenza di aritmie ventricolari³⁵.

Tali cellule, infatti, non esprimendo il gene per la Connexina 43 (CX 43), sono impossibilitate a formare gap-junctions³⁶ con la conseguente mancanza di un corretto accoppiamento elettro-meccanico [Fig.5].



Questo si ripercuote sulla funzionalità cardiaca con il verificarsi di numerosi eventi aritmici, motivo per il quale nel corso dello studio MAGIC, i ricercatori si sono visti costretti a posizionare nei pazienti trattati, dei defibrillatori impiantabili.

Prescindendo dai rilievi di Chien, il primo problema da affrontare è quello della morte cellulare, poiché interessa circa l'80-90% delle cellule trapiantate e che si verifica principalmente nel corso delle 48 ore seguenti l'iniezione. Questo è infatti un fattore che limita considerevolmente gli effetti benefici della procedura, tenuto conto della relazione quasi lineare che esiste tra il numero di elementi cellulari trapiantati nel miocardio, la diminuzione del *remodelling* ventricolare sinistro ed il miglioramento della funzionalità cardiaca.

L'impossibilità pratica di aumentare in maniera indefinita il numero delle cellule trapiantate (soprattutto per problemi di natura aritmica) sottolinea l'importanza di una strategia alternativa, che consiste piuttosto nell'ottimizzare e quindi prolungare la sopravvivenza delle cellule trapiantate.

Tra i fattori responsabili della morte cellulare, la scarsa ritenzione che si verifica nel momento stesso del trapianto, l'ipovascolarizzazione delle zone infartuate, l'ambiente "ostile" del tessuto ospitante e di conseguenza l'ischemia ed i fenomeni citotossici a carico delle cellule trapiantate rappresentano la causa maggiore. La prova è data dalla constatazione che la sopravvivenza delle cellule trapiantate è doppia nel momento in cui le iniezioni vengono effettuate in un tessuto di granulazione riccamente vascolarizzato in opposizione ad una cicatrice fibrosa e ciò è confermato dai benefici in termini di funzionalità cardiaca conseguenti l'induzione di un'angiogenesi complementare al trapianto di cellule.

Attualmente, la possibilità di indurre una neo-angiogenesi³⁷ è fondata su dei mezzi “esogeni”, ovvero basata sulla somministrazione di cellule transfettate con un gene codificante per un fattore di crescita angiogenetico oppure sulla somministrazione di una proteina-fattore di crescita³⁸.

Per efficace che sia, questo tipo di approccio pone dei problemi di sicurezza per quanto concerne l'applicazione clinica, soprattutto nel caso della terapia genica che utilizza vettori di espressione retrovirali³⁹.

Altro meccanismo alternativo è rappresentato da una rivascolarizzazione per via percutanea o chirurgica, cosa che però comporterebbe un intervento “invasivo” nei confronti dei pazienti. Intervento che peraltro non sempre potrebbe rappresentare il “gold standard” terapeutico per il paziente in questione (Cardiomiopatie dilatative, Post-partum, ecc.)

Proprio in questo contesto, al fine di evitare tali difficoltà sembra più logico e sicuro esplorare una strategia alternativa fondata sull'induzione farmacologica di un'angiogenesi di natura endogena e cercare di creare le migliori condizioni possibili per un trapianto cellulare. L'ultimo quesito da affrontare concerne la tipologia di cellula staminale da utilizzare: le cellule ottimali da utilizzare nella terapia cellulare dovrebbero soddisfare, una serie di criteri di sicurezza ed efficacia. Esse devono essere post-natali (al fine di evitare problematiche di tipo etico, rischi di trasformazione tumorale e mancata differenziazione specifica); autologhe (per evitare la conseguente e necessaria terapia immunosoppressiva); commissionate per la differenziazione cardiaca (per garantire un'efficiente rigenerazione); facili da isolare, espandere ed usare a fini terapeutici.

Dati sperimentali ottenuti dal nostro gruppo di ricerca, suggeriscono l'esistenza di cellule staminali cardiache residenti nel cuore adulto, con potenzialità di

differenziamento verso i vari tipi cellulari presenti nel cuore (cardiomiociti, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce). Abbiamo infatti isolato con successo cellule staminali cardiache (CSCs) da frammenti biotici endomiocardici umani, murini e suini, espandendole in vitro per diverse generazioni pur conservandone le potenzialità differenziative in cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce²⁰.

Questo comporterebbe, proprio in virtù delle caratteristiche intrinseche di questa popolazione cellulare, anche un certo grado di angiogenesi che si presuppone possa lavorare sinergicamente alla ripopolazione cellulare. Le cellule staminali cardiache da noi isolate ed espanse, rappresentano, a nostro avviso, l'opzione più promettente per la terapia rigenerativa cardiaca non comportando problematiche di tipo etico né tantomeno complicanze di natura immunologica come le cellule staminali embrionali ed essendo cellule cardiache perfettamente in grado di integrarsi con il tessuto ospite. Questi risultati rappresentano un presupposto per la successiva fase traslazionale clinica.

Purtroppo, però, come già menzionato, la terapia cellulare, in generale, soffre ancora di limitazioni correlate alla variabilità dell'engraftment cellulare e all'alta percentuale di morte per apoptosi che fa seguito al trapianto⁴⁰ (circa 80-90%). Inoltre, questo tipo di approccio risulta inadeguato o quantomeno insufficiente in caso di lesioni infartuali di notevoli dimensioni.

Inoltre, dal momento che la matrice miocardica extracellulare è profondamente alterata nella cardiopatia ischemica⁴¹, sarebbe auspicabile adottare una procedura in grado di rigenerare sia le miocellule sia la matrice stessa. La matrice extracellulare del ventricolo sinistro, infatti, riveste un ruolo importante nel mantenimento della conformazione (shape) ventricolare sinistra. Il tessuto connettivo cardiaco è principalmente composto da collagene con una quota minore di elastina, laminina e

fibronectina⁴². I due tipi principali di fibre collagene nel miocardio sono il tipo I e III, prodotti dai fibroblasti e dai miofibroblasti. Studi sperimentali hanno dimostrato che nella patologia ischemica cardiaca il collagene di tipo I interstiziale diminuisce del 50% nella fase acuta dell'infarto del miocardio⁴³.

Proprio in questo contesto risulta utile sottolineare come la ricerca nel campo dell'ingegneria tissutale applicata alla patologia cardiaca abbia compiuto notevoli progressi negli ultimi anni e numerosi studi in vivo ed in vitro ne attestano le notevoli potenzialità terapeutiche. L'ingegneria tissutale si caratterizza per la crescita e la differenziazione di cellule nel contesto di una matrice biodegradabile, fino a dare luogo ad un tessuto morfologicamente riconoscibile, sia in vitro che in vivo. Si presuppone che la matrice, andando incontro a biodegradazione, formi un tessuto, composto dalle cellule originariamente sedimentate e dalle cellule dell'ospite infiltrate, che possa favorire la riparazione di un'area non funzionante tramite un processo di rigenerazione cardiaca, più protetto dai segnali infiammatori e apoptotici: una sorta di “nicchia” capace di conferire un certo grado di protezione nei confronti degli elementi cellulari e parallelamente in grado di permettere un delivery graduale e controllato nel tempo delle cellule.

Sono state recentemente sviluppate, tecniche di bio-ingegneria che prevedono l'incorporazione delle cellule staminali in matrici biodegradabili con formazione di biocomplessi, al fine di migliorare la sopravvivenza e la differenziazione delle cellule staminali stesse in vivo⁴⁴.

Tali costrutti incorporano gli elementi cellulari in una struttura tridimensionale [Fig. 5] che può essere utilizzata per sostituire l'area di miocardio danneggiata in una maniera più fisiologica ed efficace: infatti, le matrici a base di collagene sono in grado

di reintegrare la matrice extracellulare cardiaca danneggiata a seguito dell'insulto ischemico⁴⁵.



Figura 5

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto

Tuttavia non sono stati ancora identificati i biocomplessi matrice/cellula staminale più adeguati. La nostra ipotesi è che le cellule staminali cardiache autologhe da noi isolate ed espanse, possano rappresentare la scelta più efficace e realistica da utilizzare per la creazione di biocomplessi. La possibilità di mettere a confronto, l'attività biologica delle CSCs, con quella di altri tipi di cellule staminali adulte (sulle quali sono già stati condotti numerosi studi pre-clinici e clinici), dovrebbe definitivamente individuare e caratterizzare i vantaggi e gli svantaggi del migliore biocomplesso applicabile nella pratica clinica. La valutazione di parametri come la sopravvivenza cellulare, la rigenerazione ed il rimodellamento tissutale e l'angiogenesi in risposta all'impianto dei

biocomplessi sarà determinante nell'individuazione della migliore combinazione cellula-matrice.

Infine, la creazione di un modello sperimentale animale ottimale e la messa a punto di protocolli diagnostici per il monitoraggio in vivo del comportamento delle cellule staminali servirà come punto di partenza per la realizzazione di studi pre-clinici in animali di grande taglia e di studi clinici di fase I-II. Per tutte queste ragioni, lo scopo dei nostri studi è volto a sviluppare, terapie ibride basate sull'utilizzo dell'ingegneria tissutale in combinazione con la terapia cellulare, al fine di mettere a punto potenziali nuovi approcci per la riparazione del tessuto miocardico. **Ok(Taylor art)**

Piano sperimentale, metodologia generale

L'ipotesi testata in questo lavoro sperimentale è quella di valutare l'azione sinergica di biomateriali associati agli elementi cellulari da noi isolati ed espansi, al fine di creare nuovi tessuti cardiaci. Un'accurata analisi dei parametri (sopravvivenza cellulare, formazione di tessuti, rimodellamento cardiaco ed angiogenesi in risposta all'impianto dei biocomplessi) contribuirà all'identificazione della combinazione ottimale cellule/biomateriali per riparare il danno miocardico. In sintesi, questo progetto, concernente l'applicabilità della terapia cellulare in associazione all'ingegneria tissutale nelle patologie ischemiche cardiache, consta di 3 fasi principali:

- 1) Isolamento, espansione, differenziazione ed organizzazione di cellule staminali cardiache in una matrice bioingegnerizzata;
- 2) Ottimizzazione dell'engraftment e della sopravvivenza cellulare mediante la creazione di un miocardio "bioartificiale";
- 3) Messa a punto di nuove metodologie per il trapianto cellulare e di elaborazione quantitativa dei risultati funzionali tramite acquisizioni ecocardiografiche seriate.

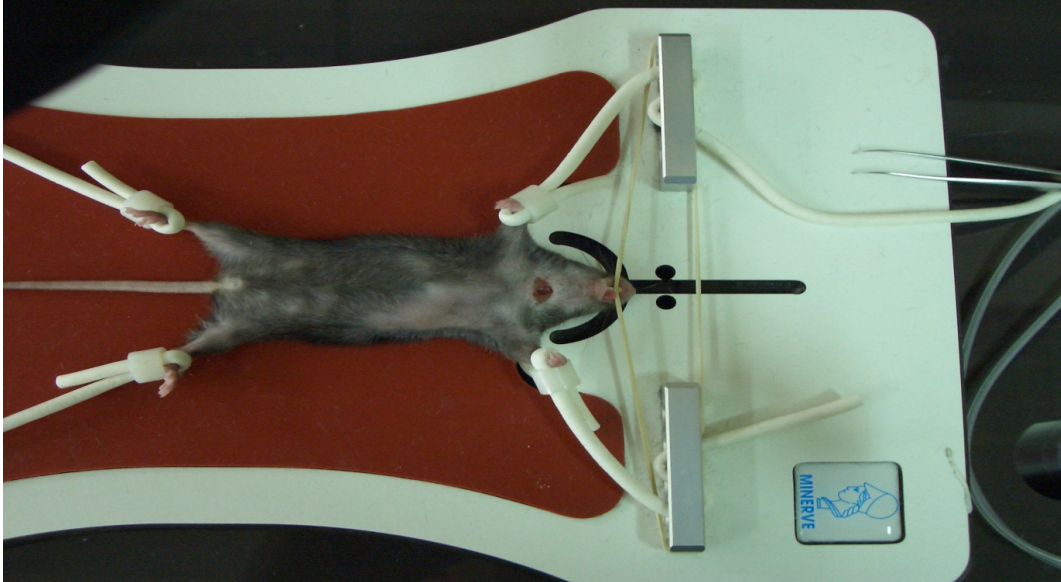
Tale sperimentazione, prevede due fasi ben distinte, la prima effettuata in vitro, la seconda in vivo, tramite la creazione di un modello sperimentale animale di piccola taglia.

Modello sperimentale animale

Il modello animale utilizzato in questo studio è quello dell'infarto miocardico creato sul topo. Infatti, abbiamo messo a punto, nel corso degli anni, una metodica affidabile e riproducibile, a basso indice di mortalità (circa il 12% di mortalità intraoperatoria), che ci consente di ottenere un modello sperimentale di infarto miocardico nel topo, mediante legatura della coronaria discendente anteriore [Fig. 6]. Gli animali sono anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di ketamina (90mg/kg) e xylazina (10 mg/kg). Si procede quindi al posizionamento sul tavolo operatorio ed alla depilazione del torace e del collo.

Previa disinfezione del campo operatorio, la cute viene incisa a livello della regione anteriore del collo; si procede successivamente, alla dissezione delicata dei piani

muscolari fino ad arrivare alla visualizzazione della trachea. A questo punto mediante una cannula specifica (Harvard n.2) si procede ad un'intubazione oro-tracheale sotto visione diretta.[Fig. 6].



▲ **Figura 6** - Visualizzazione chirurgica della trachea per intubazione

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto

Formattato: Tipo di carattere: Grassetto, Italiano (Italia)

A questo punto viene istituita un'assistenza respiratoria artificiale mediante un ventilatore specifico (Harvard Apparatus, Model 843, South Natick, MA). Frequenza respiratoria e tidal volume sono impostati in base al peso di ciascun animale (tidal volume di circa 140/160 microlitri e frequenza respiratoria di circa 190/210 atti/minuto per un animale di circa 22 grammi).

L'accesso alla cavità pericardica è ottenuto mediante una toracotomia laterale sinistra. Terminato questo primo tempo chirurgico infatti, si incide la cute a livello del IV/V spazio intercostale sinistro, si procede alla dissezione delicata dei piani

muscolari fino ad arrivare alla visualizzazione del corrispettivo spazio intercostale.

[Fig. 7].



Figura 7 - Visione diretta del IV spazio intercostale

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto, Italiano (Italia)

Mediante forbici di Potts si incide il piano muscolare e si penetra all'interno del mediastino.

In questa fase bisogna prestare attenzione a non ledere il polmone di sinistra, cercando di mobilizzarlo nella maniera più delicata possibile. Vengono quindi passati a livello degli spazi intercostali III e V da due a quattro punti 6-0 Ti-Cron al fine di divaricare il più possibile lo spazio creato, rendendo possibile la visualizzazione diretta della parete laterale del ventricolo sinistro e di parte dell'auricola sinistra [Fig. 8].



Figura 8 - Visione diretta del solco atrio-ventricolare

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto, Italiano (Italia)

Il pericardio viene gentilmente rimosso e si procede alla localizzazione della coronaria discendente anteriore visualizzabile alla sua emergenza dal solco atrio-ventricolare sinistro. Una volta individuata la coronaria, essa viene legata prossimalmente, a cuore battente, mediante una sutura di prolene 7-0 [Fig.9].

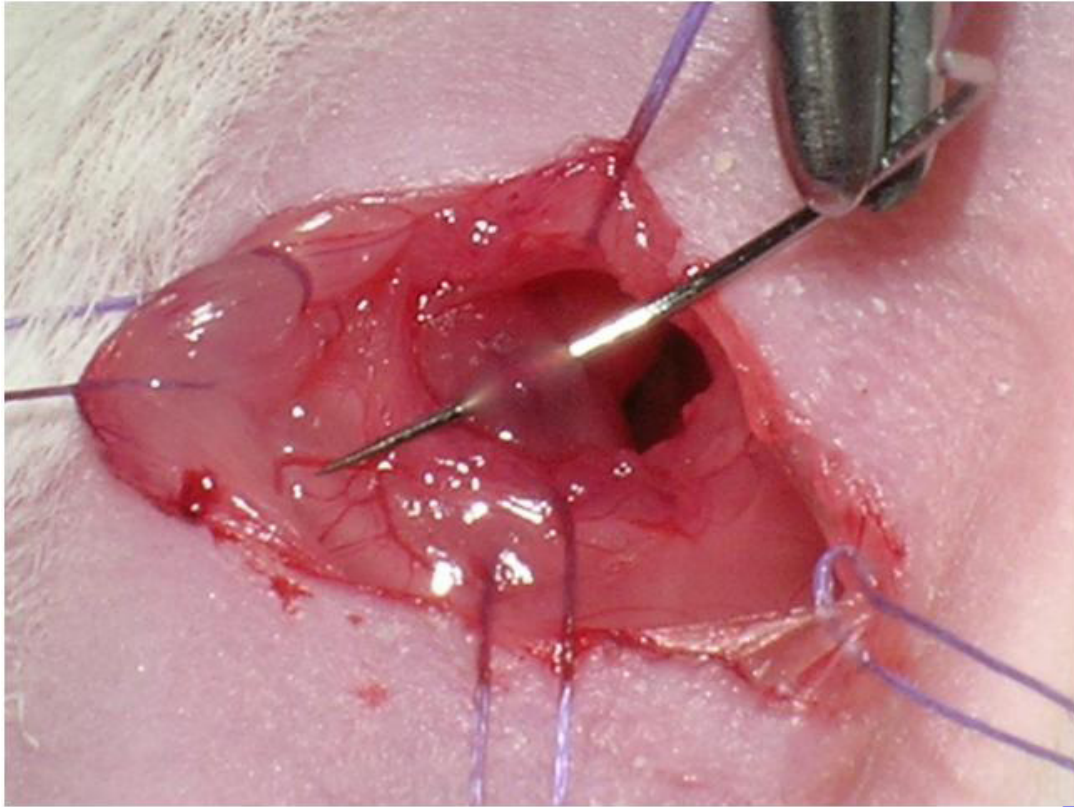


Figura 9 – Legatura della Coronaria

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto, Italiano (Italia)

L'efficacia della legatura è chiaramente verificabile attraverso una marcata riduzione della contrattilità miocardica ed una netta demarcazione della zona divenuta ischemica. Una volta indotto l'infarto miocardico gli animali sono assegnati in maniera casuale ad uno dei gruppi di studio:

- Gruppo I controllo (iniezione di 15 μ l di mezzo di coltura).
- Gruppo II creazione dell'infarto ed apposizione sulla superficie epicardica di una matrice di collagene di tipo I non preparata (senza elementi cellulari).

- Gruppo III iniezione di 5 milioni di cd/cds nelle zone peri/infartuali e apposizione sulla superficie epicardica di una matrice di collagene di tipo I precedentemente preparata/sedimentata con 5 milioni di cd/cds.

Circa 30 minuti dopo la creazione dell'infarto vengono praticate le iniezioni delle cellule in 2/3 differenti siti dell'area ischemica. Ogni siringa contiene 5 milioni di cellule sospese in mezzo di coltura (M 199) per un volume complessivo iniettato di 15 microlitri. Nessun tipo di terapia immunosoppressiva viene istituito. Gli scaffold di matrice sono costituiti da collagene di tipo I, di natura bovina, liofilizzato, non denaturato, disponibile in commercio (Pangen 2, Urgo Laboratory, Chenove, France). Per essere utilizzata nel nostro modello la matrice viene preparata in elementi circolari delle dimensioni di circa 4x3x1,5 mm, successivamente posizionata in piastre contenenti mezzo di coltura (Medium 199) e sedimentata mediante gli elementi cellulari. Le piastre vengono fatte centrifugare per 5 minuti alla velocità di 900 giri/minuto per promuovere la regolare distribuzione delle cellule all'interno della matrice. Nel tempo immediatamente successivo all'iniezione, la matrice così preparata viene fissata sulla superficie epicardica in corrispondenza della zona ischemica mediante una sutura riassorbibile (7-0, Vicryl). Dopo aver eseguito un'accurata emostasi ed uno svuotamento del cavo pericardico mediante un tubicino

28 G raccordato ad una siringa da insulina, si procede alla chiusura per piani mediante sutura in 6-0 VICRYL [Fig. 10].



Figura 10 - Aspirazione cavo pericardio

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto, Italiano (Italia)

L'animale viene quindi svezzato dal ventilatore e non si procede alla estubazione fino a quando non è in grado di respirare in maniera autonoma [Fig. 11].

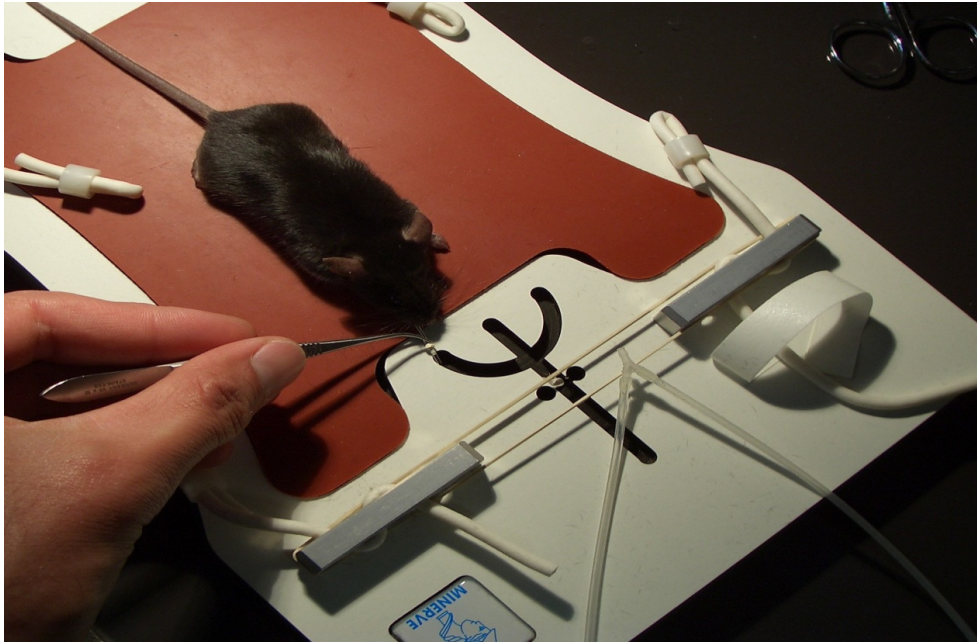


Figura 11 - Estubazione dell'animale

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto, Italiano (Italia)

Per i primi 30 minuti circa dall'estubazione l'animale viene posto in una gabbietta isolata in funzione di *recovery room*.

Una volta constatate le buone condizioni dell'animale, esso viene riportato nello stabulario e collocato in un apposito armadio dotato di specifici sensori per ventilazione, umidità e temperatura.

Tutte le procedure sugli animali sono eseguite secondo i protocolli della European Convention on Animal Care.

Isolamento, espansione, differenziazione ed organizzazione di cellule staminali cardiache in una matrice bioingegnerizzata;

Culture cellulari. Il tessuto umano è stato ottenuto da biopsie ventricolari di pazienti di età compresa tra 58 ed 81 anni, sottoposti ad intervento cardiocirurgico, in conformità alle linee guida del Ministero della Sanità. Il tessuto murino è stato derivato dai cuori di topi C57/Black. Il tessuto miocardico isolato viene ridotto in frammenti di 1-2 mm³, lavato con Ca-Mg-free PBS (*Invitrogen*), e digerito per 10 minuti a 37°C con tripsina 0,2% (*Invitrogen*). I frammenti di tessuto così ottenuti sono lavati con *complete explant medium* (CEM) (IMDM addizionato del 20% di siero fetale bovino [*Euroclone*], 100 U/ml penicillina G, 100 µg/ml streptomicina, 2mmol/L L-glutamina e 0,1 mmol/L 2-mercaptoetanol), e sono messi in coltura come espianti in CEM a 37°C e 5% CO₂, su piastre Petri rivestite di fibronectina umana (*Invitrogen*). Dopo un periodo variabile da 1 a 2 settimane (topo) o dalle 2 alle 4 settimane (uomo), uno strato di cellule fibroblastoidi viene generato dagli espianti aderenti, al di sopra del quale migrano piccole cellule rifrangenti. Queste ultime cellule vengono raccolte con 2 lavaggi con Ca-Mg-free PBS, un lavaggio di 1-2 minuti con 0,53 mmol/L EDTA (*Versene, Invitrogen*), ed un lavaggio di 2-3 minuti con tripsina 0,2% a temperatura ambiente e sotto controllo visivo. Le cellule così raccolte vengono coltivate in piastre *multiwell* da 12 pozzetti ricoperte di poly-D-lisina (*BD Biosciences*), ad una densità di $0,5-2 \times 10^5$ cellule/ml, in *cardiosphere-*

growing medium (CGM) (35% IMDM-65% DMEM-Ham F12 mix, contenente 2% B27 [Invitrogen], 1 ng/mL EGF [PeprTech], 20 ng/mL bFGF [PeprTech], 40 nmol/L cardiotropina-1 [PeprTech], 40 nmol/L trombina [Sigma]; 2-mercaptoetanolo, antibiotici e L-Gln come nel CEM). La raccolta di queste cellule formanti cardiosfere può essere effettuata più volte dalla stessa coltura primaria, ad intervalli di 3-5 giorni (topo) o 6-10 giorni (uomo). Le cardiosfere formatesi nei pozzetti dopo 3-4 giorni vengono raccolte con un debole spipettamento, in modo da non asportare anche le cellule singole aderenti, e dopo una blanda disgregazione meccanica, vengono piastrate in fiasche ricoperte di fibronectina umana in terreno CEM. Le cellule delle cardiosfere così coltivate, crescono in monostrato aderente, e sono passate ogni 3-4 giorni ad un rapporto 1:3, con parziale sostituzione del terreno. Le cellule dal monostrato su fibronectina possono essere di nuovo piastrate su poly-D-lisina, in modo da ottenere nuovamente le cardiosfere. **[Fig. 12]**

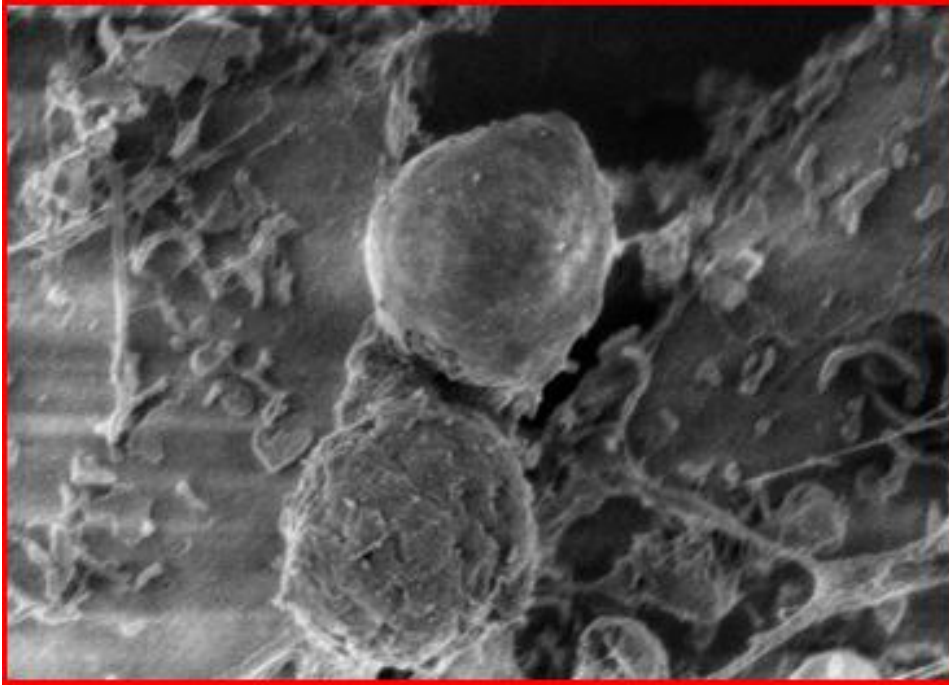


Fig. 12 - Microscopia a scansione; cardiosfere a 7 gg.

Formattato: Tipo di carattere:
Grassetto, Italiano (Italia)

Preparazione della Matrice di Collagene

Le matrici di collagene⁴⁶ sono preparate sulla base di un kit disponibile in commercio (*Pangen 2, UrgoLaboratory, Chenove, France*). Le matrici vengono sottoposte ad un trattamento Cross-Linking RGD (Tri peptide Arg-Gly-Asp) al fine di ottimizzare i tempi di degradazione e di assorbimento all'interno del tessuto ospite [**Fig. 12**].



Fig. 12- Matrice trattata con RGD

Per essere utilizzata nel nostro modello animale, la matrice viene poi preparata in elementi circolari delle dimensioni di circa 4x3x1,5 mm, successivamente posizionata in piastre contenenti mezzo di coltura (Medium 199) e sedimentata mediante gli elementi cellulari. Le piastre Elisa vengono fatte centrifugare per 5 minuti alla

velocità di 900 giri/minuto per promuovere la regolare distribuzione delle cellule all'interno della matrice stessa.

Le matrici da noi utilizzate hanno infatti la caratteristica di presentare dei micropori delle dimensioni di 50-100 μm che hanno lo scopo di funzionare come una sorta di “nicchia” per le cellule che vi si andranno a collocare [Fig. 13-14].

La velocità ed i tempi di centrifugazione sono stati ottenuti sulla base di diverse sperimentazioni.

Di fondamentale importanza infatti sono da un lato la regolare distribuzione degli elementi cellulari all'interno della matrice stessa , dall'altro la conservazione delle stesse cellule che a maggiori regimi di rotazione potrebbero subire dei danni di natura meccanica.

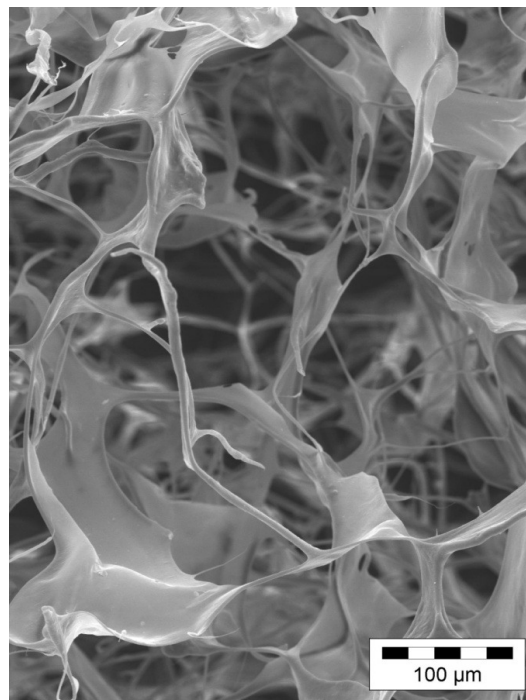
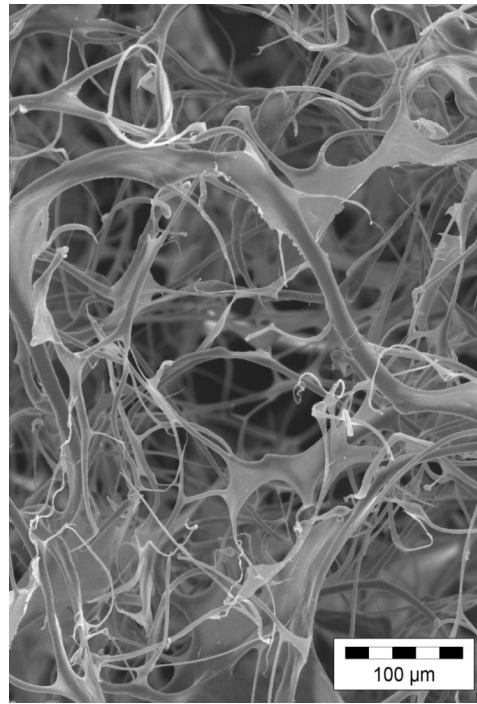


Fig. 13- Matrice di collagene visualizzata al microscopio elettronico a scansione.

Particolare della struttura che mette in evidenza i micropori.

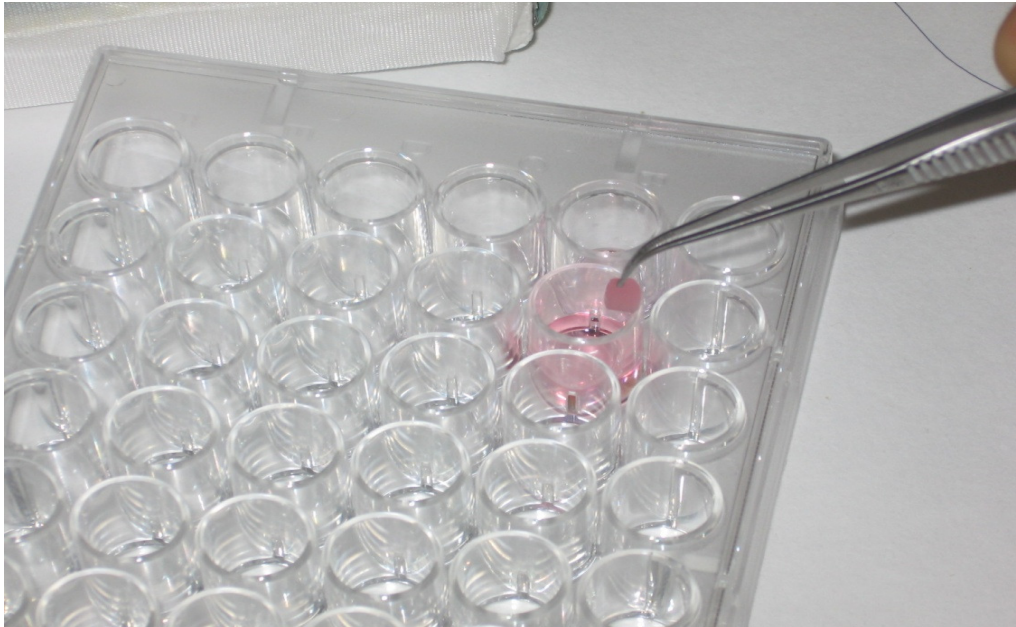


Fig. 14- Matrice preparata con Csc

Valutazione funzionale dei risultati, metodologia, criteri

Funzione ventricolare sinistra

L'ecocardiografia è stata ampiamente utilizzata per valutare nei modelli animali le modificazioni morfologiche e funzionali indotte da trattamenti farmacologici o da procedure chirurgiche.

Si tratta infatti di una metodica estremamente versatile e rapida da utilizzare che consente una valutazione quantitativa e non invasiva delle dimensioni del cuore, spessori parietali, strutture valvolari e soprattutto della funzione cardiaca. La valutazione ecocardiografica del cuore murino è sempre stata limitata dal

relativo basso frame-rate delle immagini in relazione alla elevata frequenza cardiaca (da 400 a 600 battiti per minuto) e da una meno dettagliata visualizzazione delle strutture più vicine alla sonda. L'ottimizzazione delle immagini cardiache richiede infatti un compromesso ottimale tra la frequenza degli ultrasuoni emessi, il potere di penetrazione e la risoluzione spaziale degli ultrasuoni stessi.

La maggior parte degli studi finora condotti, sono stati realizzati mediante utilizzo di sonde da 10 a 15 Mhz, che hanno un frame-rate di circa 120-160 Hz. Inoltre, la tecnica M-mode, grazie all'elevatissimo frame-rate, è stata frequentemente utilizzata per la valutazione delle dimensioni e della funzione globale del ventricolo sinistro; tuttavia quest'ultima metodica è fortemente limitata dalla capacità di eseguire una valutazione su una sola linea di scansione, impedendo pertanto la corretta valutazione della funzionalità cardiaca globale e regionale.

I recenti progressi tecnologici hanno consentito la realizzazione di sonde di piccole dimensioni che hanno sia la capacità di eseguire scansioni a bassa profondità che di ottenere un elevato frame-rate. Sono state infatti prodotte delle nuove apparecchiature equipaggiate con sonde ad elevata frequenza (20-40 Mhz) che consentono una visualizzazione ed uno studio ottimale del cuore murino.

Inoltre è adesso possibile aggiungere alla valutazione ecocardiografica mono e bidimensionale le informazioni flussimetriche mediante il Doppler pulsato e lo studio del movimento di parete mediante Tissue Doppler Imaging.

L'utilizzo di mezzi di contrasto per somministrazione endovenosa, è inoltre stato introdotto di recente nello studio ecografico del cuore murino, mostrando una migliore capacità di valutazione della funzione cardiaca globale e regionale con minore variabilità inter ed intra-osservatore.

Il modello animale di infarto del miocardio viene creato con un topo scid dell'età compresa tra le 8 e le 10 settimane. Il topo viene anestetizzato con una somministrazione intraperitoneale di Ketamina (90 mg/Kg) e Xylazina (10 mg/Kg). In questa fase viene effettuato l'ecocardiogramma basale completo di acquisizione monodimensionale (M-mode), bidimensionale (B-mode), Doppler-flussimetrico. La cute deve essere pulita con alcool o acqua, allo scopo di incrementare il contatto tra la sonda e il torace.

Particolare attenzione viene posta dall'operatore nel posizionare la sonda. Difatti, un'eccessiva pressione della sonda sul torace può provocare bradicardia ed ipotensione.

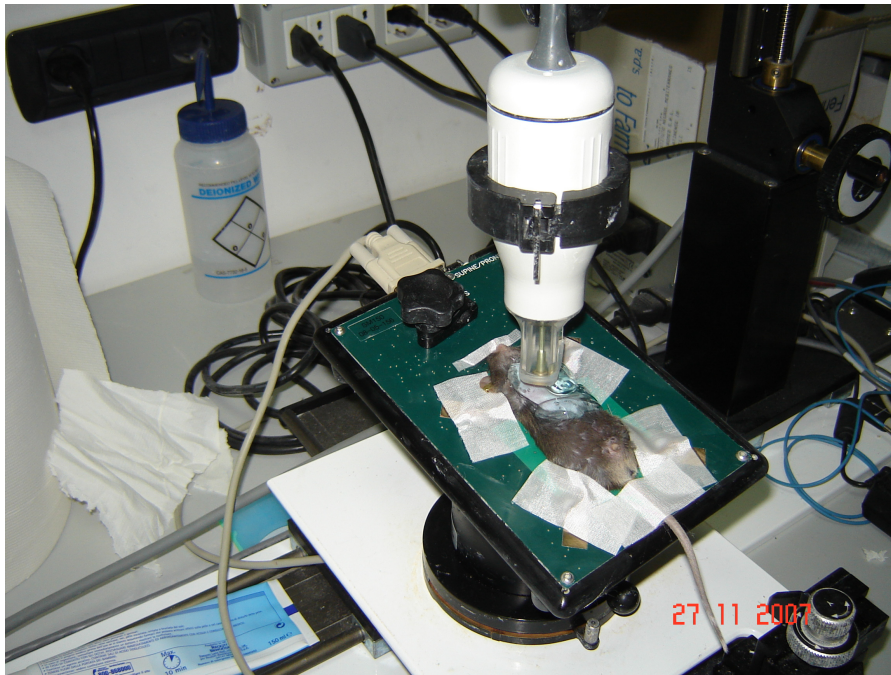


Fig. 10- Proiezione parasternale sinistra

La prima proiezione utilizzata è quella parasternale in asse lungo del ventricolo sinistro in cui vengono visualizzate: la valvola aortica, la valvola mitrale, le camere cardiache sinistre (atrio e ventricolo), il setto interventricolare e la parete posteriore. Sotto la guida dell'immagine bidimensionale viene, perpendicolarmente al ventricolo sinistro, fissata l'immagine monodimensionale per la successiva analisi "off-line", sfruttando l'alto "frame rate" per la stima dei vari diametri e spessori della specifica area di interesse. Analoga procedura viene effettuata dalle immagini in asse corto

comprendenti la porzione basale, la porzione media e la porzione apicale del ventricolo sinistro. Successivamente, la sonda viene posta in posizione apicale 4 e 5 camere e, con il volume campione Doppler, si registrano le velocità di flusso mitralico ed aortico.

Il topo viene quindi incubato con procedura chirurgica e posto in assistenza ventilatoria. Il torace viene aperto con una toracotomia laterale sinistra e il sacco pericardio rimosso. La coronaria discendente anteriore viene identificata e legata con una sutura di polene o virile con il cuore battente e l'area di danno miocardio identificata. La toracotomia viene chiusa con una sutura assorbibile dopo aver aspirato la cavità pericardica.

In condizioni di base e successivamente dopo aver creato l'infarto, varie e consecutive analisi ecocardiografiche (1, 7 giorni, 3 settimane e a 45 giorni) vengono effettuate sul topo sedato con tribromoetano, al fine di ottimizzare le immagini cardiache e, al tempo stesso, di deprimere solo leggermente la contrattilità e la frequenza cardiaca. Difatti, quale parametro di riferimento, viene utilizzata, per un'ottima acquisizione delle immagini, una frequenza cardiaca intorno ai 400 battiti per minuto (bpm). Il topo viene posto su un'apposita pedana termoriscaldata, bloccando gli arti su 4 placche metalliche per la rilevazione elettrocardiografia. Le microimmagini ad alta risoluzione vengono acquisite con

un'apparecchiatura "Visualsonics VeVo 770® (ecocardiografo specifico per animali di piccolo taglia, Mountain View,California,USA) equipaggiato con una sonda da 40 MHz (40 MHz probe®, **Fig 9**).



Fig.9- Sonda da 40 MHz

Il "frame rate" nell'immagine bidimensionale viene settata sui 100 Hz ad una lunghezza focale tra i 12.5 mm e i 12.7 mm. Le immagini di Doppler pulsato vengono acquisite con il più piccolo dei volume campione (0.5 mm) ad una velocità dello schermo di 200 mm al secondo.

Il ventricolo sinistro viene diviso in 16 segmenti di cui 6 basali, 6 medio-ventricolari e 4 apicali corrispondenti alle pareti: anteriore, laterale, posteriore, inferiore, settale posteriore e anteriore.

L'analisi della cinetica regionale viene determinata utilizzando 3 gradi di analisi quantitativa: normale, marcata ipocinesia e acinesia. Le dimensioni del ventricolo sinistro, la frazione di accorciamento e l'ispessimento delle pareti ventricolari anteriore e posteriore vengono effettuate sotto al guida bidimensionale in asse corto a livello dei muscoli papillari. I diametri telediastolico (LVEDD) e telesistolico (LVESV) sono usati per il calcolo della frazione di accorciamento (FS) secondo la seguente formula:
$$\%FS = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \times 100.$$

La frazione di accorciamento dell'area del ventricolo sinistro e la frazione di eiezione sono gli indici della fase di eiezione più utilizzati per valutare la performance sistolica del ventricolo sinistro. Questi indici sono dipendenti dalle condizioni di carico e perciò non consentono di distinguere le alterazioni primitive della contrattilità da quelle indotte da alterate condizioni di carico. La frazione d'eiezione, in ogni caso, viene calcolata con il metodo di "Simpson" applicato all'immagine ottenuta dalla finestra apicale 4 camere. Inoltre, la massa ventricolare sinistra viene calcolata sia attraverso la formula del cubo tramite un approccio monodimensionale dalla finestra parasternale asse lungo/asse

corto: massa = 1.05 (LVEDD + PV + IVS) 3-LVEDD 3) sia tramite la formula di Simpson (metodo 2D area-lunghezza) usando un approccio bidimensionale parasternale asse lungo/asse corto: LV mass = 1.05 (5⁄ 6 AI (L+T) – 5⁄ 6 A2LJ.

L'utilizzazione del "Simpson rule" può essere sfruttata anche per la determinazione delle dimensioni della massa infartuata rispetto alla massa totale del ventricolo sinistro. Le immagini sequenziali in asse corto del ventricolo sinistro sono acquisite dalla base fino all'apice. Il bordo endocardio e quello epicardio in telediastole vengono delineati unitamente ai bordi dei segmenti acinetici del miocardio. La distanza di ciascuna immagine in asse corto e quella successiva in tutta la lunghezza del ventricolo sinistro sono acquisite in modo equidistante al fine di ottenere il volume della massa infartuata (area x spessore = volume x 1.05).

Il flusso transmitralico viene registrato ponendo il volume campione all'estremità dei lembi valvolari mitralici nella loro fase di apertura sull'immagine ottenuta dalla finestra apicale 4 camere. Il flusso transvalvolare aortico viene ottenuto ponendo il volume campione subito al di sotto della valvola aortica, nel canale di efflusso del ventricolo sinistro utilizzando l'immagine ottenuta dalla proiezione apicale 5 camere. Ottenendo dalla parasternale asse lungo il diametro del canale di efflusso del ventricolo sinistro unitamente al flusso transvalvolare aortico registrato dalla finestra

apicale, viene calcolato lo “stroke volume” e quindi la portata cardiaca.

Lo stroke volume è dato dal prodotto tra l'integrale di velocità del flusso aortico e l'area aortica. La portata cardiaca è ottenuta moltiplicando lo stroke volume per la frequenza cardiaca.

Le principali fonti di errore nel calcolo della portata cardiaca con metodica Doppler riguardano:

- 1) Inadeguato allineamento tra fascio ultrasonoro e aorta ascendente;
- 2) impossibilità di misurare con precisione il diametro aortico. Le misurazioni Doppler della portata cardiaca sono utili per valutazioni seriate, piuttosto che come determinazioni assolute.

Con l'ausilio el Doppler pulsato è possibile calcolare:

1. Velocità di picco aortica e polmonare
2. Tempo di rilasciamento e di contrazione isovolumetrico
IVRT/IVCT
3. Tempo di eiezione del ventricolo sinistro
4. Pattern di flusso mitralico

Da questi dati si può calcolare il *Tei Index*, un indice di performance miocardia che combina la funzione ventricolare sistolica e diastolica del ventricolo sinistro. I topi, infine, vengono monitorizzati misurando sia il volume che la pressione

intraventricolare attraverso un catetere micromanometro (Millar 1.4 F, SPR, Millar Instruments, INc, USA) posizionato nel ventricolo sinistro dall'arteria carotide comune di destra. Il dP/dT max esprime la funzione sistolica mentre il dP/dT min e la costante del tempo di rilasciamento identifica la funzione diastolica.

Analisi istologica

Una valutazione macroscopica del cuore al momento del sacrificio ha evidenziato che in tutte le aree ischemiche del ventricolo sinistro erano presenti delle aderenze causate da tessuto connettivo e/o fibroso, e la matrice che si stava riassorbendo nella parete del ventricolo **[Fig. 17]**.

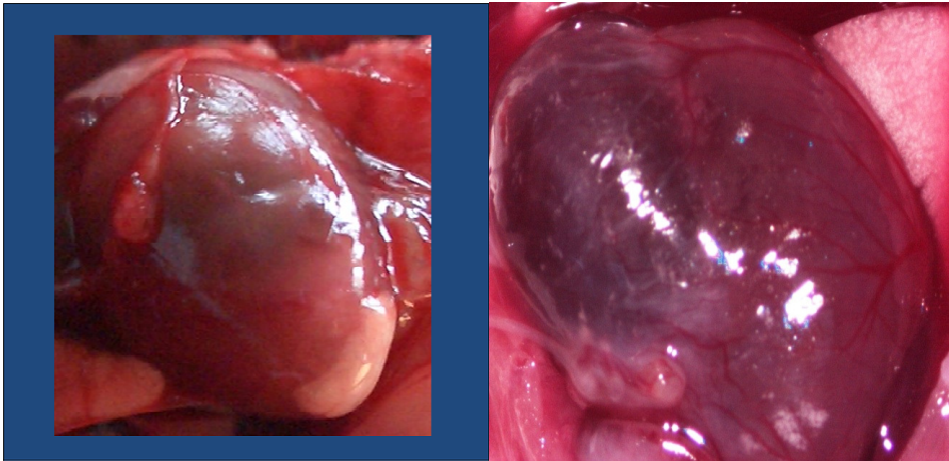


Fig. 17 - Osservazione macroscopica/anatomia patologica; a) Biocomplesso al momento del sacrificio b) marcata dilatazione aneurismatica del ventricolo sinistro in un topo controllo.

L'esame istologico sui cuori espantati è stato condotto in due porzioni principali:

- a) la prima è oggetto sia di uno studio istologico standard (ematossilina-eosina) al fine di quantificare le reali dimensioni dell'infarto (misurate mediante planimetria informatizzata) e di valutare l'eventuale presenza di cellule/biocomplessi trapiantati.

- b) la seconda porzione di tessuto è oggetto di immuno-marcaggi mediante l'ausilio di anticorpi verso differenti epitopi. Nello specifico sarà caratterizzata l'espressione

morfologica di CSs e CDCs con la microscopia ottica (MO), la microscopia confocale (CM) e con la microscopia elettronica a scansione (SEM). [Fig.18]

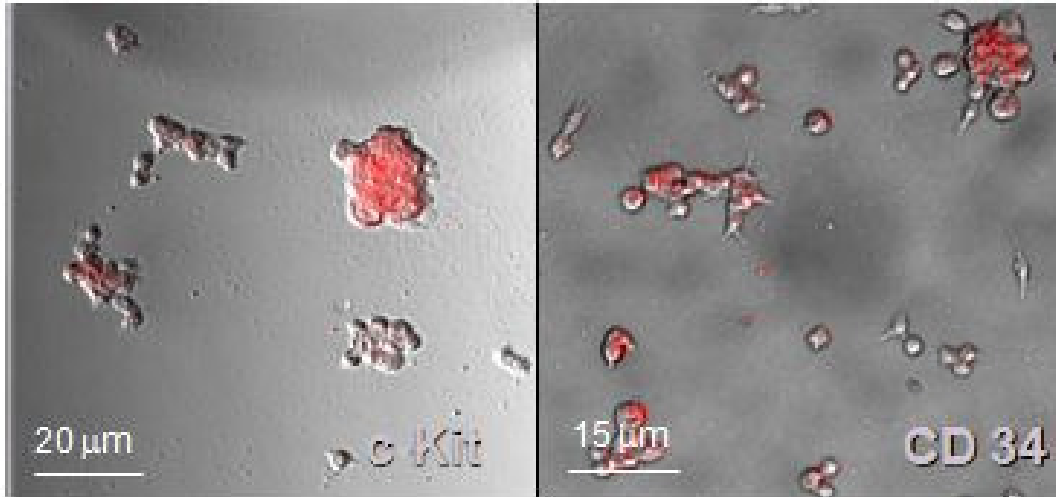


Fig. 18 – Microscopia Confocale positività per c-Kit e CD 34

La caratterizzazione immunofenotipica sarà effettuata utilizzando i seguenti anticorpi: SCA-1, Troponina1, -actina muscolo liscio, vWf, fibronectina, Human Nuclear Antigen c-Kit, -actina sarcomerica, Ki67. Lo studio comparativo tra i casi e i controlli permetterà il riconoscimento del grado di differenziazione immunofenotipica delle cellule staminali in cardiomiociti specializzati. [Figg. 19 -20)

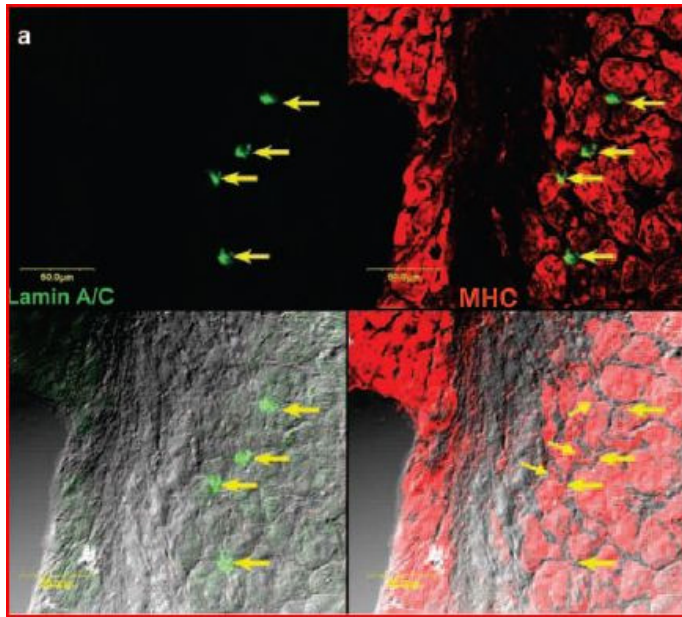
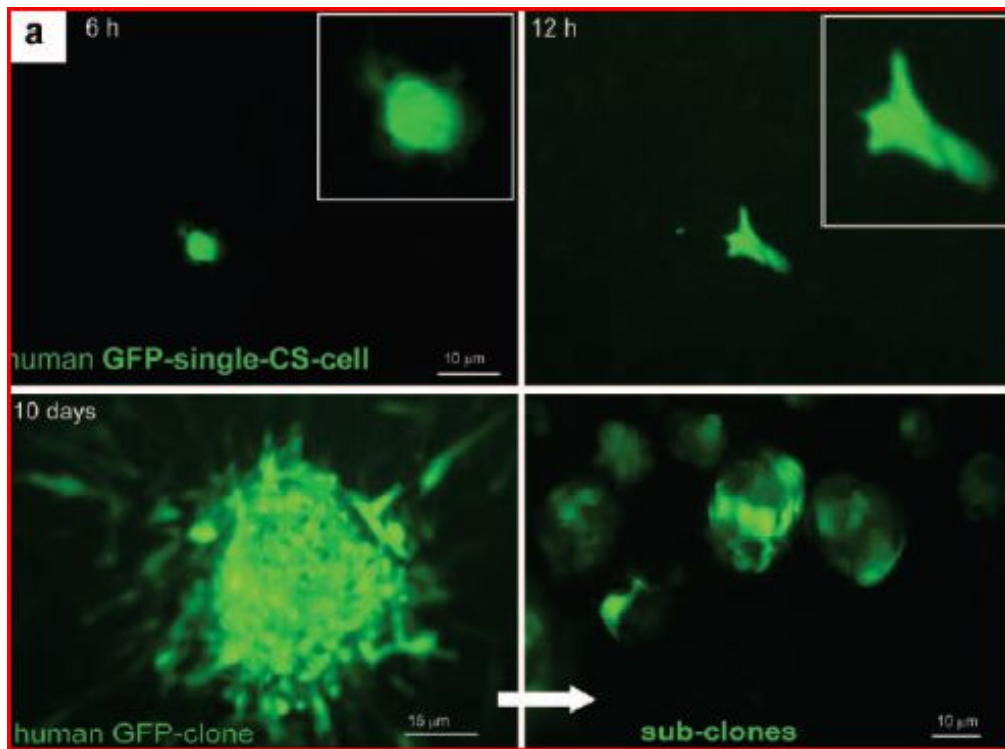


Fig. 19 – Microscopia confocale, positività per Lamin/MHC



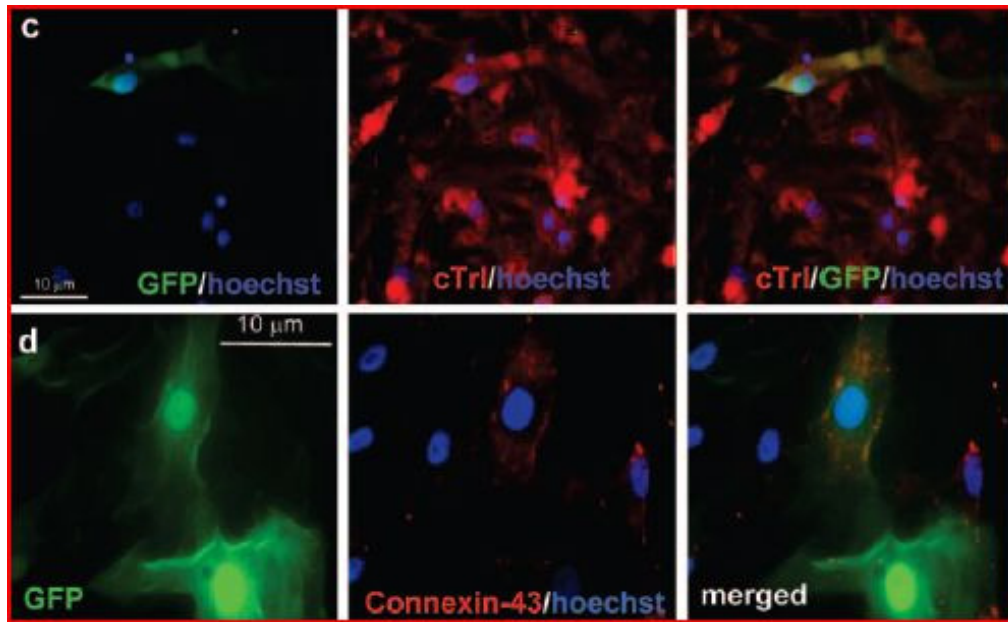


Fig. 20 – Analisi confocale a fluorescenza, positività per Tr e Connexina 43.

La rigenerazione miocardica indotta dalla terapia con cellule staminali verrà valutata morfologicamente su sezioni colorate con x-Gal , Ematossilina/Eosina e tricromica di Masson, PAS e Alcian, per determinare e quantificare, attraverso il sistema computerizzato di analisi di immagine, le differenti zone (zone indenni, zone ai limiti della lesione e zone infartuate) dei tessuti miocardici murini danneggiati dall'ischemia. Saranno inoltre allestite altre sezioni consecutive per le analisi immunohistochimiche per vWf, CD31 e CD34 allo scopo di valutare e quantificare l'angiogenesi. **[Figg. 21-22]**

In conclusione l'elaborazione di tutti i dati ottenuti dovrebbe permettere di individuare le migliori condizioni colturali corrispondenti alla migliore

sicurezza ed efficacia come comprovato dagli esperimenti in vivo (per sviluppare e brevettare un protocollo che fornisca un metodo adatto all'ingegnerizzazione delle Cellule Staminali Cardiache autologhe) con matrici biodegradabili utilizzabili nella medicina rigenerativa cardiaca.

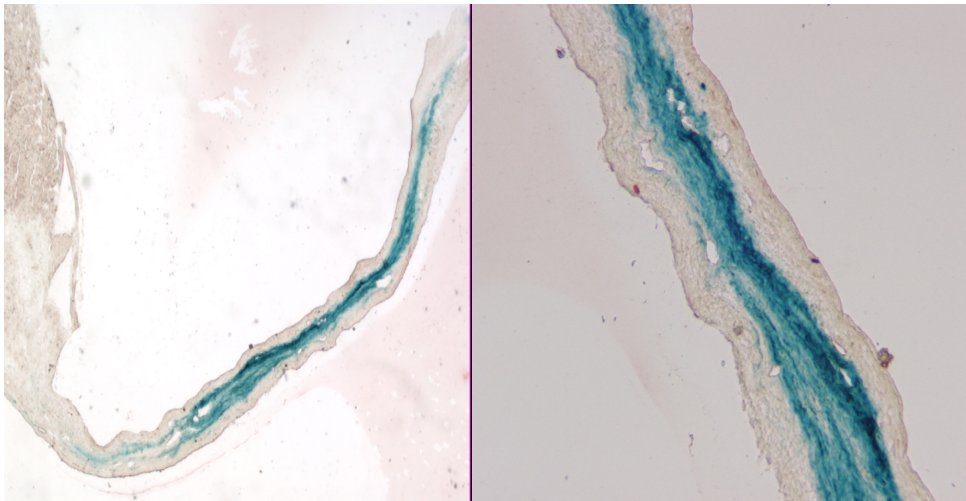


Fig. 21 - Colorazione X-Gal; presenza delle cellule all'interno della cicatrice infartuale. (Ingrandimento 2,5x e 20x.)

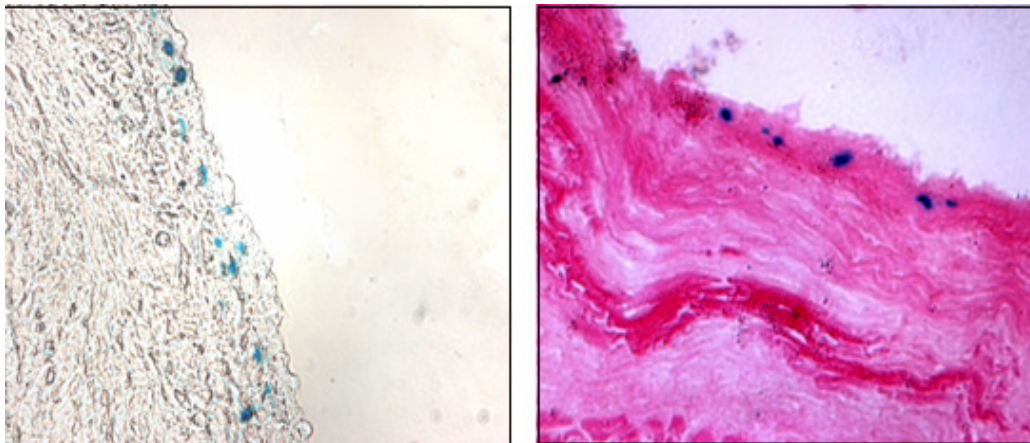


Fig. 22 - a) immagine al contrasto di fase di una sezione di tessuto cardiaco, in cui è possibile rilevare la presenza di cellule β -gal; b) sezione colorata con X-gal e con ematossilina-eosina per evidenziare i cardiomiociti

Risultati

Per questo studio sono stati sottoposti ad infarto miocardico mediante legatura della coronaria discendente anteriore, secondo il protocollo precedentemente descritto, 45 topi (CB57/BL6,SCID, età 8-10 settimane, peso 23 ± 4 g).

La mortalità intraoperatoria si è attestata intorno al 12%, quella perioperatoria intorno al 16%. Circa quattro settimane dopo la creazione dell'infarto i 23 animali rimanenti sono stati randomizzati in tre gruppi sperimentali (Gruppo I-controllo; Gruppo II-matrice; Gruppo III-cellule + matrice) e sono stati sottoposti alla valutazione funzionale ecocardiografica in anestesia generale indotta mediante tribrometanolo (2,5% tribromoethanol) secondo le tempistiche e le modalità precedentemente descritte.

Il primo controllo ecografico eseguito al 7° giorno postoperatorio (T1) ha evidenziato una severa discinesia della parete anteriore, e non ha

documentato differenze significative in termini di Frazione di Eiezione (LVEF) e Volume Telediastolico (EDV) fra i diversi gruppi esaminati che mostravano valori sovrapponibili. Al secondo controllo ecografico, eseguito al 45° giorno postoperatorio (T2), il Gruppo III presentava un EDV significativamente più basso ($62,52 \pm 6,67$) rispetto sia al gruppo di controllo ($89,52 \pm 5,59$) che a quello trattato con la sola matrice ($86,75 \pm 6,3$). Per quanto concerne la FE (Frazione di Eiezione) è stato osservato un significativo miglioramento al secondo controllo ecografico nel III Gruppo che mostrava una FE del 43,9% contro il 23,1% del II Gruppo e il 22,7% del I Gruppo. La valutazione dello spessore della parete del ventricolo sinistro, espresso in millimetri, misurato a livello delle aree infartuali, ha mostrato una parete ventricolare ispessita nel gruppo III ($0,75 \pm 0,016$), rispetto sia al controllo ($0,56 \pm 0,014$) che al gruppo II ($0,59 \pm 0,018$) [Tab. III].

L'ecocardiografia ha pertanto dimostrato che l'associazione tra le cellule e la matrice è stato il più efficace approccio per limitare il rimodellamento cardiaco e la dilatazione ventricolare post-ischemica [Fig. 23 -24].

Gruppi	LVEDV1 μl	LVEDV2 μl	LVEF1 %	LVEF2 %
Controllo	44.4	96.8	31.2	22.7
Matrice	44.1	86.8	32.2	23.1
Matrice + CS	45.8	52.3	32.0	43.9

Tabella III

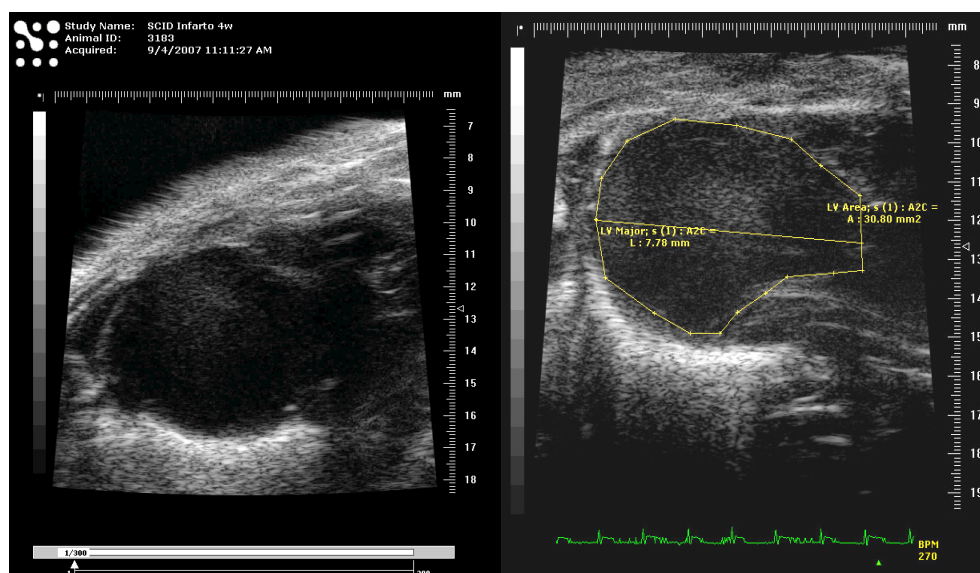


Fig. 23 - Animale controllo; marcata dilatazione ventricolare sinistra

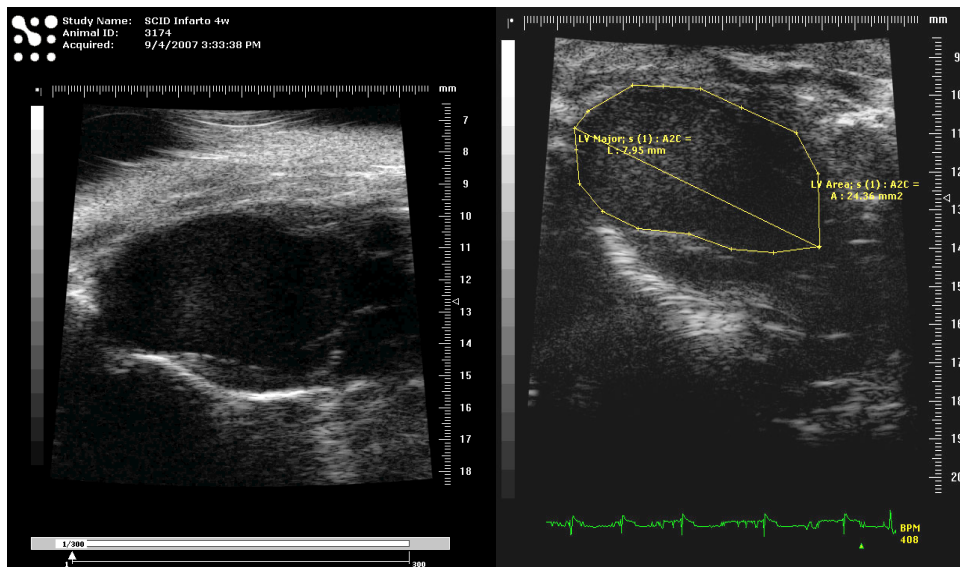


Fig. 24 - Animale trattato con biocomplessi; riduzione dei fenomeni di remodellin

Discussione

Poiché il rimodellamento del ventricolo sinistro conseguente ad infarto del miocardio può portare ad una progressiva insufficienza cardiaca, prevenire il processo di rimodellamento post-ischemico è un importante aspetto terapeutico nello scompenso cardiaco post-ischemico. Sebbene agenti terapeutici come gli ACE inibitori, i β -bloccanti, e gli antagonisti

dell'aldosterone prevengono il rimodellamento cardiaco e riducono la morbilità e la mortalità nei pazienti con scompenso cardiaco conseguente ad IMA, nessuna di queste terapie è in grado di porre rimedio al problema fondamentale che è rappresentato dalla perdita funzionale dei cardiomiociti. La perdita acuta di cardiomiociti e della matrice extracellulare cardiaca, induce una dilatazione ventricolare precoce, che è associata con un deterioramento della funzione cardiaca nella fase tardiva.

La matrice extra cellulare è un complesso costituito da fibrille collagene, elastina, cellule comprendenti fibroblasti e macrofagi, macromolecole come glicoproteine, e glicosaminoglicani insieme con altre molecole come fattori di crescita, citochine, e proteasi extracellulari. I fibroblasti cardiaci sono la popolazione cellulare numericamente più numerosa nel miocardio e sono responsabili della deposizione della matrice extracellulare. La matrice extracellulare cardiaca, che è assimilabile ad un network 3D nel cuore, è costituita prevalentemente da fibrille collegane di tipo I e III. La deposizione, sia normale sia patologica, di fibrille collagene nel cuore è implicata nella regolazione dei componenti della matrice extracellulare come l'elastina, la laminina e la fibronectina. Le fibre collagene forniscono supporto strutturale e danno al cuore proprietà che includono e resistenza alle deformazioni. Inoltre, le fibre collagene” hanno mostrato un importante ruolo come legame tra elementi contrattili

e miociti adiacenti, trasportando utili informazioni per la funzione cellulare.

Dopo infarto miocardico, cellule infiammatorie come i neutrofili, i monociti, e i macrofagi, si infiltrano nella zona infartuata, e le fibre collagene di tipo II cominciano a rimpiazzare i miociti necrotici nel miocardio danneggiato. Questo processo avviene uniformemente in tutta l'area infartuata e determina il grado dell'espansione iniziale. La prevenzione della dilatazione, secondaria al rimodellamento del ventricolo sinistro, può aumentare la performance cardiaca. L'ingegneria tissutale cardiaca sembrerebbe una valida opzione terapeutica nella prevenzione di questi fenomeni di remodelling. Gli obiettivi principali nelle strategie di riparazione cardiaca includono: sviluppo dell'angiogenesi e della miogenesi, prevenzione dell'apoptosi, e preservazione dell'omeostasi della matrice extracelullare al fine di mantenere l'integrità strutturale sia dei tessuti infartuati sia di quelli non coinvolti dall'insulto ischemico, nonché protezione del ventricolo sinistro da ulteriori dilatazioni.

Questo settore terapeutico emergente è stato oggetto di studi sperimentali sia con cellule staminali di derivazione embrionale sia con cellule staminali adulte derivanti da cellule progenitrici. L'identificazione di cellule cardiache progenitrici residenti ha fatto sì che il campo della

biologia rigenerativa cardiaca abbia fatto dei passi in avanti a livelli sorprendenti.

Con questo studio sperimentale abbiamo dimostrato:

1) che è possibile isolare ed espandere cellule staminali cardiache da frammenti bioptici (murini ed umani);

2) che questo procedimento consente di raggiungere un numero di cellule adeguato per un trattamento “in vivo”;

3) che è possibile far sedimentare le cellule all’interno di matrici di collagene opportunamente trattate (RGD);

4) che l’associazione cellule/matrice favorisce il recupero della funzionalità cardiaca a seguito di un insulto ischemico e previene i fenomeni di remodelling post-ischemici.

Studi su animali di grossa taglia (maiale) sono in corso per validare sia il modello che la procedura da noi utilizzata nel modello sperimentale murino, ciò con l’obiettivo di portare a termine la fase traslazionale e per poter attuare il passaggio alla fase clinica qualora dovessimo ottenere risultati positivi in termini di sicurezza ed efficacia. L’ambizioso obiettivo di questa fase sperimentale è quello di arrivare, dunque, al passaggio alla sperimentazione clinica sull’uomo ed utilizzare la terapia cellulare in combinazione con l’ingegneria tissutale come nuovo approccio per la riparazione del tessuto miocardico.

Ciò aprirebbe nuove prospettive di applicazione clinica della terapia cellulare in associazione all'ingegneria dei tessuti nell'ambito delle patologie cardiovascolari.

Bibliografia

- 1) Bizzozzero G, *Sulla funzione ematopoietica del midollo delle ossa.*
Rendiconti C.R. Ist Lomb Sci Lett 1868;1:815-818

- 2) Carrel A, *Rejuvenation of cultures of tissues*. J Am Med Ass 1911;57,1611;
- 3) Carrel A, Burrows MT, *Cultivation of tissues in vitro and its technique*. J Exp Med 1911;13:387-96; 415-21
- 4) Singh P, Williams DJ. *Cell therapies: realizing the potential of this new dimension to medical therapeutics*. J Tissue Eng Regen Med. 2008 Jul 10.
- 5) Kastenberg ZJ, Odorico JS. *Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells*. Transplant Rev (Orlando). 2008 Jul;22(3):215-22. Epub 2008 May 14.
- 6) Rosenthal N, *Prometheus's vulture and the stem-cell promise*. New England J Med 2003;349:267-174;
- 7) Scott CT, Reijo Pera RA. *The road to pluripotency: the research response to the embryonic stem cell debate*. Hum Mol Genet. 2008 Apr 15;17(R1):R3-9.
- 8) Chen L, Daley GQ, *Molecular basis of pluripotency*, Hum Mol Genet. 2008 Apr 15;17(R1):R23-7

- 9) Levine A. *Trends in the geographic distribution of human embryonic stem-cell research*. Politics Life Sci. 2004 Sep;23(2):40-5.
- 10) *ES-cell friendly*; Natur Biotechnol 2004;22:1207
- 11) Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M. *Adult stem cells and their trans-differentiation potential-perspectives and therapeutic applications*. J Mol Med. 2008 Jul 16.
- 12) Murry CE, Soonpaa MH, Relnecke H, Nakajima HO, Rupart M, Pasumarthi KBS, Virag JJ, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ, *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature 2004;428:664-668;
- 13) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. *Chimerism of the transplanted heart*. N Engl J Med. 2002 Jan 3;346(1):5-15.

- 14) Anversa P, Kajstura J, Olivetti G. *Myocyte death in heart failure*. Curr Opin Cardiol. 1996 May;11(3):245-51.
- 15) Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. *Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 21;95(15):8801-5.
- 16) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med. 2001 Jun 7;344(23):1750-7.
- 17) Cheng RK, Asai T, Tang H, Dashoush NH, Kara RJ, Costa KD, Naka Y, Wu EX, Wolgemuth DJ, Chaudhry HW. *Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction and prevents heart failure*. Circ Res. 2007 Jun 22;100(12):1741-8.
- 18) Barile L, Messina E, Giacomello A, Marbán E. *Endogenous cardiac stem cells*. Prog Cardiovasc Dis. 2007 Jul-Aug;50(1):31-48.
- 19) Barile L, Cimenti I, Gaetani R, Forte E, Mirali F, Frati G, Messina E, Giacomello A., *Cardiac stem cells: isolation, expansion and*

experimental use for myocardial regeneration. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007 Feb;

- 20) Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. Circ Res.* 2004 Oct 29;95(9):911-21.

- 21) Condorelli G, Borello O, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G, *Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. Proc Natl Acad Sci US* 2001; 98:10733-38.

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

- 23) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE. *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. Nat Biotechnol. 2007 Sep;25(9):1015-24. Epub 2007 Aug 26.
- 24) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature. 2004 Apr 8;428(6983):668-73.
- 25) Kocher AA, Schlechta B, Gasparovicova A, Wolner E, Bonaros N, Laufer G. *Stem cells and cardiac regeneration*. Transpl Int. 2007 Sep;20(9):731-46. Epub 2007 Jun 6.
- 26) Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. *Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. Nature. 2005 Feb 10;433(7026):647-53.
- 27) Chien KR, *Lost in translation*. Nature 2004;428:607-608.

- 28) Smart N, Riley PR. *The stem cell movement*. Circ Res. 2008 May 23;102(10):1155-68. Review.
- 29) Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12):1210-21.
- 30) Fonarow GC. *Epidemiology and risk stratification in acute heart failure*. Am Heart J. 2008 Feb;155(2):200-7. Epub 2007 Nov 26.
- 31) Lee WC, Chavez YE, Baker T, Luce BR. *Economic burden of heart failure: a summary of recent literature*. Heart Lung. 2004 Nov-Dec;33(6):362-71.
- 32) Genovese J, Chachques E, Frati G, Cortes Morichetti MA, Patel A, Chachques JC, *Cell based Approaches for Myocardial Regeneration and Artificial Myocardium*..Current Stem Cell Research & Therapy Volume 2, Issue 2, May 2007.

- 33) Centola M, Schuleri KH, Lardo AC, Hare JM. *Stem cell therapy for myocardial regeneration: mechanisms and current clinical applications*. G Ital Cardiol (Rome). 2008 Apr;9(4):234-50.
- 34) Cleland JG, Freemantle N, Coletta AP, Clark AL. *Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE*. Eur J Heart Fail. 2006 Jan;8(1):105-10.
- 35) Smith RR, Barile L, Messina E, Marbán E. *Stem cells in the heart: what's the buzz all about? Part 2: arrhythmic risks and clinical studies*. Heart Rhythm. 2008 Jun;5(6):880-7.
- 36) Kresh JY. *Cell replacement therapy: the functional importance of myocardial architecture and intercellular gap-junction distribution*. J Thorac Cardiovasc Surg 131, 1310, 2006.
- 37) Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Müller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. *Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice*. Cardiovasc Res. 2005 Apr 1;66(1):45-54.

- 38) Liu XH, Bai CG, Xu ZY, Huang SD, Yuan Y, Gong DJ, Zhang JR. *Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: Angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction.* *Microvasc Res.* 2008 May;76(1):23-30.
- 39) Jo J, Nagaya N, Miyahara Y, Kataoka M, Harada-Shiba M, Kangawa K, Tabata Y. *Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran.* *Tissue Eng.* 2007 Feb;13(2):313-22.
- 40) Menasché Ph, *Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair.* *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004;2:21-8; Menasché Ph, *Editorial Comment,* *Nature Biotechnol* 2004;22:1211-12.
- 41) Alain f. Carpentier, Juan C. Chachques, *Association Between a Cell-Seeded Collagen Matrix and Cellular Cardiomyoplasty for Myocardial Support and Regeneration.* *Tissue Engineering* 2007 Nov;13(11):2681-7.

- 42) Herpel E, Pritsch M, Koch A, Dengler TJ, Schirmacher P, Schnabel PA. *Interstitial fibrosis in the heart. Differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy.* Histopathology 48, 736, 2006.
- 43) Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. *Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution.* Am J Pathol 90, 57, 1978.
- 44) Zimmermann WH, Didié M, Döker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T. *Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy.* Cardiovasc Res. 2006 Aug 1;71(3):419-29. Epub 2006 Apr 7
- 45) Zimmermann WH, Eschenhagen T. *Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering.* Trends Cardiovasc Med. 2007 May;17(4):134-40.
- 46) Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, et al. *Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts.* Circulation 114, 1167, 2006.

- 47) Schiller N, Shah P, Crawford M, et al. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms: recommendations for quantitation of the left ventricle by twodimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2,358, 1989.
- 48) Pollick C, Hale SL, Kloner RA. *Echocardiographic and cardiac Doppler assessment of mice*. *J Am Soc Echocardiogr* 8,602, 1995.
- 49) Needles A, Goertz DE, Karshafian R, Cherin E, Brown AS, Burns PN, Foster FS. *High-frequency subharmonic pulsed-wave Doppler and color flow imaging of microbubble contrast agents*. *Ultrasound Med Biol*. 2008 Jul;34(7):1139-51.

